**K. KISSKALT
UND M. HARTMANN
PRAKTIKUM
DER BAKTERIOLOGIE
UND PROTOZOOLOGIE**

**JENA, VERLAG VON
GUSTAV FISCHER**

MBL/WHOI

0 0301 0021100 9

Maynard M. Metcalf
Berlin, Feb. 1908.

Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie

von

Dr. Karl Kißkalt

Privatdozent
Oberassistent am hygien. Institut
der Universität Berlin

Dr. Max Hartmann

und Privatdozent der Zoologie an
der Universität und wiss. Hilfs-
arbeiter am Kgl. Institut für
Infektionskrankheiten in Berlin.

Mit 89 teils mehrfarbigen Abbildungen im Text.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

1907.

Alle Rechte vorbehalten.

Vorwort.

Das vorliegende Praktikum ist zur Ausbildung des Mediziners in der Protistenkunde bestimmt.

Der Medizin haben die letzten Jahrzehnte eine derartige Vermehrung des Stoffes gebracht, daß es für den Studierenden unmöglich ist, in alle Fächer tiefer einzudringen. Einem leicht begreiflichen Drange folgend, pflegt er vor allem für seine Ausbildung in den klinischen Fächern zu arbeiten, da ihm das konkreter und nützlicher erscheint; erst spät merkt er, daß dabei sein ätiologisches Bedürfnis nicht voll befriedigt wird, da dies nur durch eigene praktische Erfahrung geschehen kann. Zum Nachholen des Versäumten können sich viele deshalb nicht entschließen, weil sie die dazu nötige Zeit und die Schwierigkeiten überschätzen. Bei einem systematischen Vorgehen läßt sich aber beides bedeutend einschränken, und wie die Arbeit dabei zu gestalten ist, soll das vorliegende Werk zeigen. Es ist also nicht bestimmt, unsere Lehrbücher der Bakteriologie zu ersetzen, sondern es soll sie nur für den Gebrauch in der Praxis ergänzen.

Der erste Teil soll ihn befähigen, sich auf dem Gebiete der Bakteriologie die grundlegenden Kenntnisse anzueignen. — Die Anforderungen der Praxis haben dazu geführt, daß heutzutage die Auffindung schwer isolierbarer Mikroorganismen in den Vordergrund getreten ist und manchmal von Anfängern eher geübt wird, als sie sich eine wissenschaftliche Betrachtungsweise der Bakterien angeeignet haben. Treten dann neue Anforderungen an sie heran, so sind sie nicht imstande, ihnen zu genügen, da ihren Kenntnissen eine breitere Basis fehlt. Es ist daher in dem vorliegenden Werke darauf gesehen, daß erst diese erlangt wird; die Vervollkommenung in den einzelnen Methoden folgt erst in der zweiten Hälfte des ersten Teiles. Dagegen wurde, wo es angängig war, auf die pathologisch-anatomischen Vorgänge aufmerksam gemacht, um dem Lernenden immer wieder zum Bewußtsein zu bringen, daß nicht der Mikroorganismus die Krankheit ist, sondern die auf sein Eindringen erfolgende Reaktion des Organismus.

Der zweite Teil bezweckt, den Mediziner praktisch und theoretisch mit den wichtigsten Protozoen bekannt zu machen. Die Protozoen besitzen zwar noch nicht die große praktische Bedeutung für die Medizin wie die Bakterien, doch mehrt sich täglich die Zahl der bekannten patho-

genen Arten. In den Tropen spielen sogar die Protozoenkrankheiten direkt die Hauptrolle. Auch bei manchen ätiologisch noch nicht aufklärten Krankheiten kommen vermutlich Protozoen in Frage und es dürfte daher vor allem auch für die weitere ätiologische Forschung eine Ausbildung in der Protozoenkunde erwünscht sein.

Beim Studium der pathogenen Protozoen treten die Methoden des Bakteriologen, vor allem die Bedeutung der Reinkultur, in den Hintergrund gegenüber genauen morphologisch-entwicklungsgeschichtlichen, also in erster Linie mikroskopischen Untersuchungsmethoden. Vor allem steht die Entwicklungsgeschichte bei dem jetzigen Stande der Forschung in erster Reihe. Ein richtiges Verständnis derselben kann aber nur auf breiter vergleichender Basis gewonnen werden. Aus diesem Grunde sind im zweiten Teile des Praktikums vielfach nicht pathogene Arten behandelt und dabei die Entwicklung am meisten betont. Für die Auswahl der behandelten Arten war einmal ihre theoretische oder praktische Bedeutung maßgebend, dann wurde großes Gewicht auf günstige Untersuchungsobjekte gelegt, bei denen viel gesehen werden kann und die gut zu beschaffen sind. Immerhin wurde bei der Auswahl die Interessenssphäre des Mediziners stets im Auge behalten, doch hofft trotzdem der Verfasser, daß das Praktikum auch dem Studierenden der Zoologie von gutem Nutzen sein wird.

Aus den angegebenen Gründen, d. h. wegen der gebotenen Beschränkung des Stoffes ist dieser Teil noch weniger bestimmt, die Lehrbücher der Protozoenkunde und Bakteriologie zu ersetzen und es sei zur Ergänzung auf die ausführliche Bearbeitung und Zusammenstellung der pathogenen Protozoen, wie sie in dem Werk von DÖFLEIN und den diesbezüglichen Kapiteln des Handbuchs der Tropenkrankheiten von MENSE und des Handbuchs der pathogenen Mikroorganismen von KOLLE und WASSERMANN vorliegen, hingewiesen.

Die behandelten Formen und die dabei angegebenen Methoden sind vom Verfasser und größtenteils auch von Praktikanten ausprobiert.

Auf die Ausführlichkeit des Registers wurde in beiden Teilen besonderer Wert gelegt, so daß das Werk auch zum Nachschlagen Dienste leisten kann.

Das Buch ist aus der Praxis hervorgegangen: schon längere Zeit, bevor an die Drucklegung nur gedacht wurde, wurde von Praktikanten nach dem Manuskript gearbeitet. Trotzdem sind sich die Verfasser bewußt, daß sich anderwärts beim Gebrauche noch Mängel zeigen mögen und sind für Ratschläge zur Verbesserung stets dankbar.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Teil. Praktikum der Bakteriologie. Von Dr. Karl Kisskalt.

Einleitung	1

I. Hälfte des Kurses.

Herstellen der Lösungen	8
I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien	10, 14, 16, 19, 24
II. Übung: Untersuchung eines pathogenen Microorganismus. Milz- brand	13, 16, 17, 19, 22, 24, 26, 27, 29
III. Übung: Methoden zur Differentialdiagnose zwischen zwei nahe ver- wandten Bacterienarten: Typhus und Coli	21, 22, 24, 26, 28, 34
IV. Übung: Untersuchung einiger anderer pathogener Microorganismen. Geflügelcholera- und Schweinerotlaufbacillen	25, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 41.
V. Übung: Keime in Luft und Erde.	31, 32, 34, 36
VI. Übung: Nährbödenbereitung	33, 34, 36, 37
VII. Übung: Tuberkulose	35, 61, 65, 66, 77
VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen	36, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 49
IX. Übung: Diphtherie	38, 40, 41, 42, 43, 44, 46
X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen	43, 44, 46, 47
XI. Übung: Kapselbacillen	46, 48, 49, 50
XII. Übung: Desinfektion	47, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 57, 59
XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum	50, 62, 74, 76, 78
XIV. Übung: Wassermuntersuchung	55, 56, 57, 59
XV. Übung: Pneumococcen	55, 56, 58, 59
XVI. Übung: Schimmel und Hefen	57
XVII. Übung: Bacterien aus der Protensgruppe	57, 59
XVIII. Übung:	60

II. Hälfte des Kurses.

XIX. Übung: Prodigiosus, Pyocyanus	62
XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung	62, 63, 65, 66, 67, 69, 70
XXI. Übung: Bacteriolyse	65, 76, 86
XXII. Übung: Involutionenformen	66, 67
XXIII. Übung: Malignes Ödem	67, 69, 70, 71, 72, 76
XXIV. Übung: Geißelfärbung	68
XXV. Übung: Tetanus	70, 71, 72, 76, 79, 82, 83, 85
XXVI. Übung: Influenza	71, 72, 73
XXVII. Übung: Bac. botulinus	73, 80
XXVIII. Übung: Bac. enteritidis	74, 82, 83, 84, 85
XXIX. Übung: Meningococcen	74, 76, 78
XXX. Übung: Gonococcen	75, 76, 79
XXXI. Übung: Rotz	75, 83, 84, 85, 86, 88
XXXII. Übung: Hämolyse	77, 87
XXXIII. Übung: Züchten von Typhusbacillen aus Stuhl und Wasser	77, 79, 80, 81, 82
XXXIV. Übung: Phagocytose	79, 88
XXXV. Übung: Dysenterie, Paratyphus	81, 82, 84
XXXVI. Übung: Bacterieide Wirkung des Blutserums	85
XXXVII. Übung: Diphtheriegift und -antitoxin	89

	Seite
XXXVIII. Übung: Untersuchung von Tonsillen, Conjunctiva, Rachen, Harn, Fäces, Smegma etc.	90
XXXIX. Übung: Züchten von Tuberkelbacillen aus Sputum	91
XL. Übung: Pathogene Schimmelpilze	91
XLI. Übung: Bestimmung des Colititers	93
XLII. Übung: Leuchtbakterien	94

II. Teil. Praktikum der Protozoologie. Von Dr. Max Hartmann.

Einleitung	95
Allgemeine Übersicht über Bau und Entwicklung der Protozoen	98
System der Protozoen	103

I. Amöbina.

Allgemeines	105
Technische Bemerkungen	105
Spezieller Kurs. <i>Entamoeba buccalis</i>	107
<i>Entamoeba coli</i>	109
<i>Entamoeba histolytica</i>	112

II. Flagellata.

Allgemeines	113
a) Protomonadina und Polymastigina.	
Allgemeines	114
Technische Bemerkungen	115
Spezieller Kurs. <i>Bodo lacertae</i>	115
<i>Trichomastix lacertae</i>	118
<i>Trichomonas lacertae</i>	119
b) Binnelleata.	
Allgemeines	119
Technische Bemerkungen	121
Spezieller Kurs. <i>Trypanosoma lewisi</i>	122
<i>Trypanosoma brucei</i>	128
<i>Haemoproteus noctuae</i>	128
Anhang: Die Stechmücken	135
<i>Plasmodium vivax</i>	139
<i>Plasmodium malariae</i>	142
<i>Plasmodium immaculatum</i>	143
<i>Babesia canis</i>	144
c) Spirochaeta.	
Allgemeines	146
Technische Bemerkungen	147
Spezieller Kurs. <i>Spirochaeta balbianii</i>	149
<i>Spirochaeta buccalis</i> und <i>dentium</i>	150
<i>Spirochaeta pallida</i> und <i>refringens</i>	152

III. Coccidia.

Allgemeines	153
Technische Bemerkungen	155
Spezieller Kurs. <i>Eimeria stiedae</i>	156

IV. Gregarinida.

Allgemeines	159
Technische Bemerkungen	160
Spezieller Kurs. <i>Monocystis spec.</i>	161

V. Ciliata.

Allgemeines	163
Technische Bemerkungen	164
Spezieller Kurs. <i>Opalina ranarum</i>	165
<i>Balantidium entozoon</i>	166
<i>Nyctotherus cordiformis</i>	168

I. TEIL.

Praktikum der Bakteriologie.

Einleitung.

Der bakteriologische Teil des Praktikums ist so eingerichtet, daß in 60 Tagen die wichtigsten Methoden und Tatsachen der Bakteriologie durchgenommen werden. Für jeden einzelnen Tag ist das Arbeitspensum vorgeschrieben; der siebente Tag ist als Sonntag freigelassen. Erforderlich ist eine tägliche Arbeitszeit von 2—3 Stunden. Zur Einhaltung dieser Zeit ist es empfehlenswert, jedesmal zunächst das Pensum des ganzen Tages durchzulesen, da öfters mehrere Übungen gleichzeitig vorgenommen werden können.

Vorausgesetzt werden die Kenntnisse eines histologischen Kurses, speziell die Kenntnis des Mikroskopes; nur die Ölimmersion wird im folgenden näher erklärt werden.

Für die Übungen sind folgende Gegenstände und Materialien nötig:

Objektträger, Deckgläser, 6 hohlgeschliffene Objektträger. Die Höhlung darf nicht zu niedrig sein.

Petrischalen („Platten“): Glasschalen von etwa 10 cm Durchmesser und 1 cm Höhe mit Glasdeckel (Fig. 1).

7 ebensolche nach v. Drigalski-Conradi mit 20 cm Durchmesser (Fig. 1).

Kleinere Glasschalen (Kartoffelschalen) von 5 cm Durchmesser und 2 cm Höhe mit Glasdeckel (Fig. 1).

Reagenzgläser aus gutem Glas, das öfteres Erhitzen auf 150° verträgt ohne sich zu trüben. Am besten haben sich uns von Lantenschläger bezogene bewährt.

Reagenzglasgestell. Blechbecher oder Holzkiste (z. B. Zigarrenkiste) durch Scheidewände abgeteilt und am Boden mit Watte belegt, zum Hineinstellen der Reagenzgläser.

8 Glaskölbchen zu 100 ccm (Erlenmeyerkölbchen).

2 dünnwandige Glaskolben zu 500 ccm, 4 zu 300, 8 zu 200, 10 Uhrschildchen.

1 größere Doppelschale aus Glas, in der mehrere Petrischalen Platz haben, mit Deckel.

Flaschen mit eingeschliffenem Glasstopfen: 7 zu 1000, 7 zu 300, 5 zu 200, 3 zu 100 ccm.

Weithalsige Flaschen mit eingeschliffenem Glasstopfen (Pulvergläser):
3 zu 300, 3 zu 200 cm.

5 Tropffläschchen zu 30 cm.

1 Trichter von 20, 3 von 10 cm Durchmesser.

1 Meßzylinder zu 1 l: 1 Meßzylinder mit eingeschliffenem Glasstopfen (Schüttelzylinder) zu 100 cm.

6 kurze Pipetten zu 1 cm mit $\frac{1}{10}$ Teilung in einer Blechbüchse.

1 Porzellanschale von etwa 100 cm Fassungsvermögen.

Glasrohre von verschiedener Weite.

Etiketten.

Platindraht: 2 Stücke von 6, 2 von 11 cm Länge, werden in Glasstäbe von 20 cm Länge eingeschmolzen und je einer an der Spitze zu einer Öse umgebogen. Die langen dienen nur zur Anaërobenzüchtung. (Fig. 1).

Fig. 1. Von links nach rechts: Glasdose nach Hammerl zur Anaërobenzüchtung. Cornetsche Pinzetten von oben und von der Seite. Platinnadeln und Platinösen; dreieckig zugebogener Glasstab zum oberflächlichen Ausstreichen auf Nährboden. Doppelschale nach v. Drigalski-Conradi. Petrischale (mit abgenommenem Deckel). Kleine Glasdoppelschale.

Cornetsche Pinzetten zum Festhalten der Deckgläser, mindestens 2 (Fig. 1).

5 Scheren von etwa 13 cm Länge.

2 Skalpelle.

1 Pravazsche, Spritze mit Asbestkolben zu 1 cm, 1 zu 5 cm, jede mit 2 spitzen und 2 abgestumpften Kanülen.

5 Pinzetten, darunter auch längere.

1 Chamberlandfilterkerze.

1 Thermometer.

2 Dreifuße.

1 Wasserbad (emaillierter eiserner Topf mit Ring zum Einhängen in einen Dreifuß).

2 emaillierte eiserne Töpfe von 25 cm Durchmesser mit Deckel zum Auskochen alter Kulturen.

Asbestdrahtnetz zum Kochen über der Flamme.

2 Kessel aus Eisenblech zum Einstellen von Reagenzgläsern mit Nährboden, etwa 18 cm hoch und so breit, daß sie eben in den Dampftopf gesetzt werden können; Boden mit Löchern.

1 Bunsenbrenner mit Spartflamme auf den Tisch des Laboratoriums¹⁾.

1 dreiflammiger Bunsenbrenner.

Gummischläuche von verschiedener Dicke, je 1 m.

1 Trockensterilisationsschrank (doppelwandiger Kasten aus Eisenblech, darunter ein Bunsenbrenner), Größe etwa 35:25:25 cm.

1 Dampftopf (Dampfkochtopf). Am besten bewähren sich zur Nährbodenbereitung diejenigen, bei denen der Dampf von unten eintritt, z. B. der alte Kochische Dampftopf, ein Zylinder mit abnehmbarem durchlochten Deckel, auf dessen Boden Wasser geschüttet und verdampft wird (Fig. 2).

Fig. 2. Dampftopf.

1 Autoklav (wünschenswert, aber teuer).

1 Wassertrockenschrank, Schränkchen von etwa 30 cm Breite, 20 cm Höhe, 15 cm Tiefe, dessen doppelte Wand mit Wasser gefüllt ist. — Durch verschieden große Einstellung der Flamme läßt er sich bei einigermaßen konstanter Temperatur des Zimmers meist leicht auf einer bestimmten Temperatur erhalten.

Brutschrank, auf 37° einzustellen. Die doppelte Wandung ist mit Wasser gefüllt; ein darin befindlicher Quecksilberregulator bewirkt, daß der Flamme um so weniger Gas zuströmt, je mehr sich die Temperatur der von 37° nähert.

Brutschrank von 23°. Tadellos funktionierende (elektrisch regulierte) sind sehr teuer; andere versagen bei hoher Sommertemperatur.

---

1) Ist keine Gasleitung im Orte, so läßt es sich, wenn auch mangelhaft, durch Spiritus oder Petroleum ersetzen.

Zu anderer Jahreszeit wird man, wenn die Temperatur des Zimmers einigermaßen konstant ist, leicht in der Nähe des Brutschrankes einen Platz finden, an dem die gewünschte Temperatur vorhanden ist.

1 chemische Wage, auf Bruchteile eines Milligramms genau (steht eventuell in einer Apotheke zur Verfügung).

1 Exsiccator; der untere Teil wird mit wasserfreiem Chlorcalcium gefüllt. (Exsiccatorfett s. S. 9.)

2 Büretten zu 50 cem mit $\frac{1}{10}$ cem Teilung.

1 Kippischer Apparat zur Entwicklung von Wasserstoff (s. S. 64 u. Fig. 26).

1 Botkinscher Apparat, bestehend aus einer Glasschale von 25 cm DM und 6 cm Höhe, einer Glasglocke und einem Drahtgestell zum Einsetzen der Petrischalen (s. S. 64 u. Fig. 26).

An Stelle der beiden letzteren (doch besser neben ihnen) Glasdosen nach Hammerl: zylindrische Dosen, in denen eine Anzahl Petrischalen übereinander Platz hat. An der Unterseite des flachen Deckels ist ein Ring eingeschliffen, in den der obere Rand der Dose paßt (Fig. 1).

1 Zählapparat nach Wolffhügel.

1 Apparat zur Formalindesinfektion nebst Ammoniakentwickler.

1 Kontaktklingelthermometer (s. S. 50).

Entfettete und (wenig) nicht entfettete Watte.

Weißer Nähseide.

Filterpapier.

1 Lupe mit 6facher Vergrößerung.

1 Mikroskop. Für die im folgenden angegebenen bakteriologischen Untersuchungen genügt ein Leitzsches¹⁾ Mikroskop mit Abbéschem Apparat, Irisblende, Okular I und III und Objektiv 3, 6 (womöglich) und Immersion $\frac{1}{12}$. Die Vergrößerungen damit sind: $I + 3 = 60\times$; $III + 3 = 80\times$; $I + 6 = 255\times$; $III + 6 = 350\times$; $I + \frac{1}{12} = 555\times$; $III + \frac{1}{12} = 800\times$. Ganz schwache Vergrößerung erhält man durch Abschrauben der Frontlinse des Objektiv 3.

1 Mikrotom z. B. von Schanze-Leipzig, Becker-Göttingen etc. Beschreibungen und Gebrauchsanweisungen sind von den betr. Firmen zu erhalten.

Über dem Arbeitsplatz im Laboratorium ist eine große Flasche anzubringen, von der das Wasser mit Gummischläuchen und Glasrohr zur Spülung der Präparate auf den Arbeitsplatz geleitet werden kann; darunter eine Glasschale oder ein Teller.

Farbstoffe und Chemikalien²⁾:

100 g Fuchsin

50 g Methylenblau medicinale

50 g Methylviolett

10 g Bismarckbraun

10 g Karmin

Eosin

Pikrinsäure

(Folgende 8 Farbstoffe von Dr. Grüblers Zentralstelle für mikroskop.-chem. Bedarf Leipzig)

10 g Safranin O

Methylgrün

Pyronin

Orcein

1) Diese seien hier nur erwähnt, weil sie infolge ihres relativ niedrigen Preises und seinem Verhältnis zur Güte in Laboratorien die gebräuchlichsten sind; selbstverständlich soll damit über andere kein Urteil gefällt werden.

2) Wo keine Zahl angegeben ist, ist meist nur eine sehr geringe Menge nötig; im Register ist zu finden, wo die Stoffe verwendet werden.

10 g Neutralrot
 20 cem Haematoxylinlösung nach
 Delafield
 20 cem polychromes Methylenblau
 20 cem Glycerinäthergemisch nach
 Unna
 5 g Jod
 10 g Jodkalium
 10 g Lithion carbonicum
 10 g Lithionchlorid
 Natriumnitrit
 Kaliumnitrat
 Oxalsäure
 Kaliumpermanganat
 Ammoniak
 Natriumhydrat
 Kaliumhydrat
 Kaliumpermanganat
 Soda
 Natriumsulfat
 Natrium aceticum fusum
 Kochsalz
 Argentum nitricum
 50 g Sublimat
 10 g Chromsäure
 Salzsäure
 25 % Schwefelsäure
 Off. Salpetersäure
 0,2 g „Osmiumsäure“
 Ferrosulfat
 10 cem Liquor ferri sesquichlorati
 10 cem Liquor ferri oxychlorati
 Zink (zur Wasserstoffentwicklung)
 50 g Cuprum sulfuricum
 Chlorecalcium zum Trocknen
 250 g Pyrogallussäure
 Acidum tannicum (Tannin)
 Acidum gallicum
 50 cem Anilin

Ac. aceticum glaciale, Eisessig: muß
 so frei von Wasser sein, daß er,
 wenn man einen Glasstab hinein-
 taucht und in die Flamme hält,
 brennt.
 20 cem Ac. carbolicum liqnefactum
 Kresolseifenlösung (besteht aus
 Kresolen und Seife zu gleichen
 Teilen)
 Formalin (= 40 % Formaldehyd-
 lösung) 300 cem: dunkel aufbe-
 wahren!
 Paraffin. Schmelzpunkt 48°
 „ „ „ 58°
 Paraffinum liquidum 2 l
 Alkohol, 5 l 96 %
 „ 1 l „absoluter“
 Phenolphthaleïn. 2 % in 96 % Alkohol
 Lackmuspapier, blaues und rotes
 150 cem Lackmuslösung nach Kubel
 und Tiemann (von C. A. F. Kahl-
 baum, chem. Fabrik, Berlin S.)
 Fickersches Typhus-Diagnostikum
 von E. Merck-Darmstadt
 Chloroform
 Toluol
 Collodium
 1 l Xylol
 Kanadabalsam
 Cedernöl
 Vaseline
 Destilliertes Wasser
 Speisegelatine
 Stangenagar
 Pepton (siccum von Witte, Rostock)
 10 g Nutrose
 Traubenzucker
 Milhzucker
 Glycerin.

Nährböden (Fig. 3): Der Anfänger mache sich erst mit dem Zweck der Nährböden vertraut, bevor er die Bereitung beginnt; es hat dies auch den Vorteil, daß er sich leichter an den selbst bereiteten Nährböden vergewissern kann, ob sie richtig ausgefallen sind. Im Laboratorium ist dies leicht durchzuführen; wer allein arbeitet, muß allerdings mit der VI. Übung beginnen. Doch sind Nährböden auch fertig zu beziehen (aber teuer), z. B. von Grubler. Nötig sind bis zur VI. Übung:

50 Röhrchen mit Gelatine, 20 mit Bouillon, 50 mit Agar, 6 mit Zuckeragar, 2 mit Lackmusmolke.

Ferner sucht man jederzeit die Gelegenheit zur Erlangung von Ascitesflüssigkeit oder menschlichem Serum auszunützen. Ascitesflüssigkeit wird in ein steriles Gefäß abgelassen, zu je etwa 10 cem in möglichst viele sterile Reagenzgläser übergeschüttet und diese in den Brut-

schrank gestellt. Diejenigen, in denen nach 3 Tagen Trübung oder Bodensatz aufgetreten ist, sind unbrauchbar. — Menschliches Serum erhält

Fig. 3. Nährböden, in Reagenzgläser abgefüllt. Von links nach rechts: gerade und schräg erstarrte Gelatine, gerade und schräg erstarrter Agar, schräg erstarrtes Serum.

man, indem man Blut einer Placenta aus der Nabelschnur in einen

Glaszylinder exprimiert, nach einigen Stunden mit einem durch die Flamme gezogenen und wieder abgekühlten Glasstab den Blutkuchen von der Wand ablöst, am nächsten Tag das abgeschiedene Serum in

Reagenzgläser füllt und wie vorher vorgeht. — Der zur Entnahme bestimmte Glaszylinder wird vorher mit Watteverschluß versehen und eine halbe Stunde bei 150° sterilisiert.

Versuchstiere: Nötig sind: graue (oder weiße) Mäuse, Kaninchen, Meerschweinchen, Tauben. — Graue Mäuse werden in einem 1 m hohen Blechkasten mit Glasfenster aufbewahrt; auf den Boden kommt Torfstreu. Will man sie herausholen, so faßt man sie mit einer 60—70 cm langen Zange am Schwanz. — Infizierte Mäuse kommen in etwa 20 cm hohe und 10—20 cm breite Gläser mit etwas Torfstreu und einem Deckel aus Drahtgeflecht, der noch mit einem Bleigewicht beschwert werden kann. Außerdem ist eine kleinere, etwa 30 cm lange Mäusezange (vom Aussehen einer langen stumpfen Schere) nötig, ferner ein Deckel mit einem Loch, das nach Bedürfnis durch ein um einen Nagel horizontal drehbares Holz größer und kleiner gestaltet werden kann, damit sowohl die Maus ganz als auch der Schwanz allein herausgeholt werden kann. — Sucht die Maus herauszuspringen, während man die Deckel wechselt, so bläst man etwas Rauch hinein, worauf sie sich stets unter die Streu verkriecht. — Mäuse werden mit in Wasser gründlich eingeweichtem Brot ohne Rinde gefüttert.

Kaninchen und Meerschweinchen werden in einem offenen Stall vorrätig gehalten; infizierte Kaninchen werden in Käfige, am einfachsten aus Holz mit Drahtgitter, infizierte Meerschweinchen in große irdene, glasierte Töpfe mit Deckel aus Draht gebracht. Nie setze man mehrere mit verschiedenen Mikroorganismen infizierte Tiere zusammen. Um gleichfarbige Tiere, z. B. Mäuse zu unterscheiden, bezeichnet man sie mit konz. Pikrinsäure (2 % in heißem Wasser lösen; beim Erkalten scheidet sich ein Teil aus).

Zur Zucht setzt man ein Männchen mit mehreren Weibchen zusammen; trächtige Weibchen werden isoliert, doch schon vor Ablauf der ersten Woche nach der Geburt mit den Männchen zusammengebracht. Für Meerschweinchen sind Hütten aus Holz zu empfehlen, die an der einen Seite abgeschrägt sind und auf dieser Hälfte einen Boden haben

(Fig. 4). Die Tiere müssen reinlich gehalten werden; sie werden im Sommer mit Grünfütter, im Winter mit Hafer, Hen, Dickwurz gefüttert; ist die Nahrung sehr wasserreich, so dürfen sie kein Wasser besonders erhalten, da sonst Durchfall erfolgt.

Oft treten Epidemien ein, die die ganze Zucht vernichten können. Man isoliert dann die Gesunden und Krankheitsverdächtigen in möglichst kleinen Gruppen, tötet die Kranken und desinfiziert den Stall.

Zu Versuchen an Mäusen und Meerschweinchen ist, wenn man einen Gehilfen hat, für die im folgenden angegebenen Versuche kein besonderes Operationsbrett nötig; dagegen für solche an Kaninchen. Das Tier wird dadurch am Kopfe gehalten, die Extremitäten festgebunden (vergl. die Kataloge der betr. Firmen).

Zu Sektionen sind mindestens 2 Bretter, eines für Meerschweinchen und Kaninchen, eines für Mäuse nötig. Ersteres hat einen erhöhten Rand, damit Blut und andere Flüssigkeiten nicht abfließen. Sie müssen so groß sein, daß die Tiere mit ausgebreiteten Extremitäten darauf liegen können. Kaninchen und Meerschweinchen werden mit ausgebreiteten Extremitäten darauf festgebunden oder festgenagelt, Mäuse mit langen Nadeln festgesteckt. Die Kadaver kommen, nachdem ihnen alles Brauchbare entnommen ist, in ein großes Glas mit roher konzentrierter Schwefelsäure, worin sie sich in kurzem auflösen, so daß ein solches für den ganzen Kurs ausreicht.

Fig. 4. Hütte zur Meerschweinchenzucht (halb von unten gesehen).

I. Hälfte des Kurses.

I. Tag.

Herstellen der Lösungen.

1. Konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung.
2. „ „ Methylviolettlösung.
3. „ „ Methyleneblaulösung. Man übergießt von dem ersten Farbstoffe 30, von den beiden anderen je 20 g mit je 300 cem 96 % Alkohol und schüttelt mehrmals des Tages um.
4. Bismarckbraun, 0,4 g in 200 cem kochendem Wasser gelöst und filtriert.
5. Safranin, 6 g in 200 cem kochendem Wasser gelöst und filtriert.
6. Lösungen zur Neißerschen Körnchenfärbung:
  - a) Methyleneblau 0,2; 96 % Alkohol 4,0; Aq. dest. 200; Ac. acet. glacial. 10,0 (= essigsäures Methyleneblau).
  - b) Kristallviolett 0,5; Alkohol 5,0; Aq. dest. 150,0.Die beiden Lösungen sind getrennt aufzubewahren.
- c) Chrysoidin 1:300, kochen und filtrieren.
7. Lithionkarmin zur Schnittfärbung: 3 g Lithion carbonicum werden in 300 cem kochendem destilliertem Wasser gelöst. Beim Erkalten scheidet sich ein Teil wieder aus. Einige Stunden nach dem Erkalten filtrieren und 7,5 g Karmin zusetzen. Nach einiger Zeit filtrieren.
8. Konzentrierte wäßrige Neutralrotlösung, etwa 1 g in 100 cem kochendem Wasser lösen und in einem Tropffläschchen im Dampftopf sterilisieren.
9. 3 l 60 % Alkohol, aus 96 % herzustellen. Davon
10. zu einem Liter 1 %.
11. zu einem Liter 3 % Salzsäure zusetzen.
12. Absoluter Alkohol. Der käufliche „absolute Alkohol“ enthält noch 1—2 % Wasser; um ihm dieses zu entziehen, glüht man Kupfersulfat in einer Porzellanschale, bis es weiß wird, bringt gleich nach dem Erkalten in ein Pulverglas soviel, daß es den Boden bedeckt und übergießt es mit „absolutem Alkohol“; über das Kupfersulfat kommt noch eine dünne Schicht Watte, damit Organe, die hineingelegt werden, nicht in direkte Berührung damit kommen.
13. Jodlösung. Jod löst sich kaum in Wasser, dagegen gut in konzentrierter Jodkaliumlösung. Man bringt daher in eine Flasche 1 g Jod, 2 g Jodkalium und 5 cem destilliertes Wasser und setzt, wenn sich alles gelöst hat, noch 300 cem Wasser zu.

14. Physiologische Kochsalzlösung. 8 g in 1 l destilliertem Wasser.
15. Sublimatlösung, konzentriert wäbrig. 21 g werden in 300 ccm kochendem destilliertem Wasser gelöst; ein kleiner Teil scheidet sich beim Erkalten wieder aus.
16. 1 l 2‰ Sublimatlösung zum Desinfizieren.
17. Kresolseifenlösung. 5prozentig in einem großen Gefäß, in das gebrauchte Deckgläser und Objektträger geworfen werden.
18. Exsiccatorfett: Erwärmen und Mischen von 1 Teil Vaseline und 4 Teilen Hammeltalg.
19. Kalilauge „50‰“. 100 g Kaliumhydrat werden in einem Meßzylinder mit destilliertem Wasser auf 200 ccm aufgefüllt. In den Hals der Flasche, in der die Lösung aufbewahrt wird, hängt man einen Streifen Filtrierpapier, damit der Stopfen nicht festklebt.

Sterilisieren der Glasgefäße.

Die Petrischalen und die Reagenzgläser werden gereinigt, die Reagenzgläser mit Stopfen aus nicht entfetteter Watte versehen und alles im Trockenschrank bei 150° eine halbe Stunde lang sterilisiert. Nach Vollendung der Sterilisation läßt man im Schrank bei geschlossener Türe langsam abkühlen.

Künstliche Beleuchtung.

Hat man mikroskopische Präparate, so übt man sich im Einstellen künstlichen Lichtes. Gasglühlicht und Flammen sind leicht einzustellen, schwerer elektrisches Glühlicht. — Man sucht zunächst durch Drehen des Spiegels möglichste Helligkeit zu erlangen, stellt dann das Präparat bei starker Vergrößerung (Ölimmersion) ein und dreht den Spiegel hin und her und den Abbé abwärts, bis man ein genaues Bild des leuchtenden Gegenstandes (z. B. des Kohlefadens des elektrischen Glühlichtes) hat. Dann dreht man den Abbé ganz wenig in die Höhe, wodurch man über das ganze Präparat größte Helligkeit erhält.

2. Tag.

Herstellung der Lösungen (Fortsetzung).

Aus den alkoholischen Stammlösungen werden folgende Lösungen hergestellt:

1. Karbolfuchsin (Ziehlsche Lösung): 100 ccm 5‰ Karbollösung (aus Acidum carbolicum liquefactum, das 100 Teile Karbol und 10 Teile Wasser enthält, herzustellen) + 10 ccm konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung. Hält sich einige Monate unverändert.
2. Verdünntes Karbolfuchsin = „Fuchsin“: die vorige Lösung 10fach verdünnt. Ebenfalls gut haltbar.
3. Löfflersches Methylenblau: 1 l 0,1‰ Kalilauge + 300 ccm konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung. Man macht sich eine größere Menge, da die Lösung beim Aufbewahren immer besser färbt. Schließlich muß sie zum Färben verdünnt werden und färbt dann besonders elektiv.
4. Anilinviolett (Anilinwassermethylviolett). 4 ccm Anilin werden mit 100 ccm destilliertem Wasser mehrere Minuten kräftig geschüttelt; dann durch ein vorher angefeuchtetes Filter filtriert (Filter wegnehmen,

wenn nur noch eine kleine Menge Flüssigkeit darinnen ist, da sonst Anilin durchgeht). Zu diesem „Anilinwasser“ werden 11 ccm konzentrierte alkoholische Methylviolett-Lösung zugesetzt. Die Lösung ist nicht lange haltbar; sie ist noch brauchbar, solange die aus ihr kommenden Präparate tief dunkelviolettschwarz aussehen. In dubio lieber neue machen.

Von Lösung 1—3 wird ein Teil in Tropffläschchen gefüllt; Lösung 4 wird in einer Flasche mit Trichter aufbewahrt, da sie jedesmal durch ein Filter auf das Präparat getropft werden muß.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien. a.

Material: Jauche, z. B. Stalljauche.

1. Untersuchung im lebenden Zustand: Man umgibt die Delle eines hohlgeschliffenen Objektträgers dünn mit Vaseline. Dann glüht man eine Platinoöse aus, um daran befindliche Keime zu vernichten. Der Platindraht glüht am schnellsten, wenn man ihn fast senkrecht in die Flamme hält. Nach einer Minute, während man ihn frei in der Luft hält, ist er wieder kalt geworden. Man taucht nun die Öse in die Jauche ein und bringt davon ein Tröpfchen auf das Deckglas, das man vorher gereinigt und in eine Cornetsche Pinzette festgeklemmt hat. Die Öse wird sofort wieder ausgeglüht. Stets soll dabei an der Cornetschen Pinzette das Erkennungszeichen, das Loch oder der Buckel am Griff, oben sein. Das Tröpfchen soll einen Durchmesser von 2—3 mm haben und möglichst dünn sein, damit auch die untersten Partien im Mikroskop gesehen werden können. Nun legt man das Deckglas mit dem Tropfen nach unten in die Delle des hohlgeschliffenen Objektträgers („hängender Tropfen“) und drückt leicht auf, so daß der innere Raum durch die Vaseline vollständig luftdicht abgeschlossen ist. Auf die Oberseite des Deckglases, gerade über dem Tropfen, wird etwas Zedernöl gebracht. Dann schließt man die Blende je nach dem Lichte etwa $\frac{3}{4}$ (2—4 mm Durchmesser), legt den Objektträger unter das Mikroskop (Immersionlinse) und dreht, bis die Linse in das Zedernöl eingetaucht ist, dann unter ständigem leichten Hin- und Herschieben des Objektträgers vorsichtig weiter bis man fühlt, daß das Objektiv auf dem Deckglas aufstößt. Nun sieht man in das Okular und dreht dabei mit der Mikrometerschraube nach oben (von links nach rechts). Nach kurzer Zeit kommen, wenn man den Tropfen genau unter dem Objektiv hat, Bakterien zum Vorschein. Ist man daneben, so erscheint eine feine Zeichnung, die durch Tautröpfchen bedingt ist, welche sich an den Wänden des wasserdampfgesättigten Raumes niedergeschlagen haben. Hat man diese scharf eingestellt, so braucht man nur nach der Seite zu verschieben, um den Rand des Tropfens zu finden. Oft ist es leichter, die Tautröpfchen einzustellen und dann nach der Seite zu gehen. Wird beim Versuch, einzustellen, das Deckglas zerbrochen, so reinigt man das Objektiv zunächst durch trockenes Abreiben mit Watte oder Leinwand vom Zedernöl, dann desinfiziert man durch leichtes Reiben mit einem in Kresolseifenlösung getauchten Tuche.

Im hängenden Tropfen sieht man: a) stäbchenförmige Mikroorganismen — Bacillen — von verschiedenster Größe, meist einzeln, oft auch zu zweien oder in Haufen, selten in Ketten; manchmal auch lange Fäden. Sie sind teils unbeweglich, teils in mehr oder minder schneller Bewegung. Man achtet darauf, ob die Bewegung konsequent nach einer Richtung

geht oder ob sie nur tänzelnd ist und sich die Bakterien nach einiger Zeit wieder an dem alten Ort befinden. Letztere (Brownische Molekularbewegung) findet sich auch bei unbeweglichen Mikroorganismen, wie auch bei unbelebten Körperchen.

b) Kugelförmige Bakterien — Coccen — von verschiedener Größe, fast stets ohne Eigenbewegung. Sie liegen teils einzeln, teils zu zweien (Diplococcen), teils in Ketten (Streptococcen), teils quadratisch angeordnet (Merista), teils kubisch (Sarcina), teils in unregelmäßigen Haufen.

c) Gekrümmte Bakterien, sehr selten klein, meist auffallend groß, oft mit so schneller Eigenbewegung, daß sie nur am Rande des Tropfens deutlich sichtbar sind, wo sie einen Augenblick halt machen.

d) Protozoen (manchmal).

e) Detritus.

Versuchsweise kann man die Blende öffnen, wodurch das ganze Bild verschwindet. Nach genügender Betrachtung wird der Tropfen vom Mikroskop entfernt und bis zum Schluß der Stunde zum Vergleich mit dem gefärbten Präparate aufbewahrt. Will man ihn dann vernichten, so faßt man zwei Kanten des Deckglases mit der Hand und dreht es so, daß eine Ecke über den Rand des Objektträgers übersteht. Der Tropfen darf am Rande der Delle nicht austreifen. Dann hebt man es an der Ecke auf und wirft es in die Kresolseifenlösung. Der Objektträger wird mit einem Tuche abgewischt.

Mögliche Fehler: a) beim Hin- und Herschieben folgt nur der Objektträger, nicht das Deckglas; beim Heben des Tubus bleibt das Deckglas daran hängen; Ursache: das Zedernöl ist zu sehr eingedickt oder die Vaselineschicht zu dünn.

b) Beim Abwärtsdrehen des Mikroskopes erscheinen nur noch undeutliche Bakterien. Ursache: der Tropfen ist zu dick.

c) Die Bakterien kommen nur matt zum Vorschein und haben einen hellen Saum. Ursache: der Tropfen ist eingetrocknet, da er nicht genügend durch die Vaseline abgeschlossen war.

d) Es kommen helle, große, kristallähnliche Figuren zum Vorschein. Ursache: weder Tropfen noch Tantröpfchen, sondern Vaseline ist eingestellt.

e) Meist ist das Gesichtsfeld zu hell (Blende weiter schließen) oder zu dunkel (Blende öffnen).

2. Untersuchung im gefärbten Deckglaspräparat. Ein Tröpfchen Jauche wird wie vorher mit der Öse entnommen und auf das von der Cornetschen Pinzette gehaltene Deckglas gebracht, dann durch Verreiben auf den größten Teil des Deckglases verteilt. Das Verreiben geschieht mit möglichst wenig Strichen, damit Wuchsverbände nicht zerrissen werden, am besten mit dem leicht gebogenen Draht, Ausglühen der Nadel. Man läßt das Präparat trocknen, was am schnellsten hoch über der Flamme geschieht, doch darf es sich dabei nicht zu stark erhitzen. Ist es trocken, so zieht man es dreimal durch die Flamme, mit einer solchen Geschwindigkeit, daß man einen Weg von 30 cm, in dessen Mitte die Flamme steht, in 2 Sekunden einmal zurück legt. Dadurch werden die Bakterien fixiert (festgeklebt durch Koagulation der Eiweißstoffe) und gleichzeitig, soweit es sich nicht um Sporen handelt, abgetötet. Ist das Präparat wieder abgekühlt, so tropft man Farblösung auf.

Die Färbung soll geschehen mit 10fach verdünntem Karbolfuchsin, unverdünntem Karbolfuchsin und Löfflerschem Methylenblau. Man tropft die Farblösung auf, so daß das Deckglas bis zum Rande damit bedeckt

ist und läßt die beiden ersten Lösungen 10, die letzte 30 Sekunden darauf. Dann spült man mit Wasser ab, nimmt das Deckglas aus der Pinzette und trocknet es zwischen Filtrierpapier. Letzteres darf niemals zum zweiten Male benutzt werden. Hierauf bringt man auf die Mitte eines Objektträgers ein Tröpfchen Zedernöl, legt das Präparat mit der gefärbten Seite nach unten darauf drückt es mit dem Finger leicht an und bringt oben darauf ebenfalls Zedernöl. Die Einstellung geschieht wie beim ungefärbten Tropfen, nur mit ganz offener Blende und bei bestem Lichte.

Man sieht: 1. in dem mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbten Präparat: Bacillen, Coccen, Spirillen, Detritus wie vorher. Protozoen sind kaum mehr erkennbar, da sie durch die Fixierung in der Flamme zerstört worden sind. Die Bakterien haben meist einen intensiv roten Farbton angenommen; doch finden sich auch schlecht gefärbte darunter; diese sind schon länger abgestorben; ihr Chromatin ist ausgelaugt. Selbstverständlich sind alle unbeweglich; doch kann es bei schlechter Fixierung vorkommen, daß sich einzelne vom Deckglase ablösen und quer durch das Gesichtsfeld ziehen.

2. In dem mit Methylenblau gefärbten Präparate sieht man dasselbe; nur treten die Bakterien vor dem Detritus und den koagulierten Stoffen aus der Jauche noch deutlicher hervor. Methylenblaufärbung empfiehlt sich deshalb besonders, wenn derartige Stoffe, Gewebsstoffe, Serum etc. vorhanden sind; dagegen sind die Präparate nicht so lange haltbar.

3. In dem mit unverdünntem Karbolfuchsin sind fast nur diese störenden Stoffe zu sehen; sie verdecken die Bakterien größtenteils; das Präparat ist überfärbt, die Farblösung für diesen Fall also unbrauchbar.

Mögliche Fehler: a) Auf der Präparatseite ist überhaupt nichts sichtbar. Ursache: das Präparat war schlecht fixiert und wurde durch das Wasser abgespült, oder man hatte die Präparatseite für die reine Seite gehalten und abgewischt oder auf der falschen Seite gefärbt.

b) Die Bakterien kommen nur undeutlich zum Vorschein: Ursachen: die Beleuchtung ist schlecht; oder: wenn gleichzeitig Tröpfchen zu sehen sind: das Präparat wurde noch feucht in das Zedernöl eingelegt, dadurch hatte sich eine Emulsion desselben in Wasser gebildet.

c) Die Bakterien sind sehr matt gefärbt; die Farbe des Präparates spielt etwas ins bräunliche: Ursache: das Präparat wurde beim Fixieren zu stark erhitzt.

Beim Färben auf dem Objektträger begegnet es Anfängern öfters, daß sie diesen mit der Präparatseite nach unten unters Mikroskop legen und dann überhaupt kein Bild erhalten.

Trennung und Züchtung der Bakterien. In den Präparaten waren noch sehr viele Arten von Bakterien durcheinander zu sehen; will man eine einzelne Art studieren, so ist es nötig, sie von allen anderen und von den sonstigen anhaftenden Stoffen getrennt zur Vermehrung zu bringen. Hierzu ist der erste Schritt die Isolierung, am einfachsten durch Plattengießen.

Technik: Man bringt drei Gelatineröhrchen in heißes Wasser, bis die Gelatine flüssig ist. Sind sie dann so heiß, daß man sie nicht bequem in der Hand halten kann, so wartet man bis dies der Fall ist, da andernfalls eingebrachte Bakterien durch die Hitze getötet werden. Da die Gelatine erst bei 23—27° erstarrt, braucht man sich nicht zu beeilen.

Ist die richtige Temperatur erreicht, so glüht man die Platinöse aus und nimmt den Wattestopfen von dem Röhrchen, behält ihn aber in der Hand und achtet darauf, daß er nirgends anstreift, damit nicht andere Bakterien daran hängen bleiben. Infektion durch die Luft ist viel weniger zu befürchten. Hängt noch Watte an dem Röhrchen, so brennt man sie ab. Dann bringt man mit der Öse ein Tröpfchen Janche in die Gelatine in der Art, daß man das Röhrchen schräg hält und das Tröpfchen an der Stelle, die eben noch von der Flüssigkeit bedeckt war, verreibt. Hierauf legt man die Öse beiseite (erst ausglühen!) und verteilt das Tröpfchen durch Drehen und Neigen in der Gelatine. Nun sind die Bakterien in der Flüssigkeit gleichmäßig verteilt; würde man sie jetzt in eine Petrischale ausgießen, so würde die Flüssigkeit erstarren, dadurch die Bakterien an dem Orte, an dem sie sich befinden, fixiert werden und sich zu isolierten Kolonien entwickeln. Doch würden diese wegen des großen Bakterienreichtums des Ausgangsmaterials zu nahe an einander stehen, so daß eine Isolierung unmöglich wäre. Deshalb legt man Verdünnungen an, in der Weise, daß man aus dem ersten Röhrchen (Original) drei Ösen in das zweite und von da, nachdem man die Öse ausgeglüht hat, 3 Ösen in das dritte bringt (1. und 2. Verdünnung). Dann gießt man die Röhrchen in die Petrischalen (der Boden muß ganz bedeckt sein) und etikettiert diese mit Bezeichnung des Ausgangsmaterials, Datum, Nährboden und Ziffern der Röhrchen (Original = I; 1. Verdünnung = II; 2. Verdünnung = III). Beim Ausgießen ist darauf zu achten, daß die Platten horizontal stehen.

In gleicher Weise gießt man dann 2 Serien Agarplatten, ebenfalls von je 3 Röhrchen. — Der Agar schmilzt erst bei 98° und erstarrt schon bei 37° . Es ist daher genau der Zeitpunkt abzapfen, an dem er soweit abgekühlt ist, daß einerseits die Bakterien eingebracht werden können, ohne daß ihnen die Wärme schadet, andererseits der Nährboden noch nicht erstarrt ist. Man kann sich die Arbeit anfangs dadurch erleichtern, daß man die Röhrchen im Wasserbad läßt, bis das Thermometer 40° zeigt und dann sofort die Platten gießt. — Eine höckerige Oberfläche der gegossenen Platten zeigt an, daß man zu lange gewartet hat.

Die Gelatineplatten und eine Serie der Agarplatten (Bezeichnung auf der Etikette!) wird bei 23° , die andere Serie bei 37° aufbewahrt; und zwar werden die Agarplatten stets umgekehrt in den Brutschrank gestellt.

II. Übung: Untersuchung eines pathogenen Mikroorganismus. Milzbrand. a.

Infektion einer Maus mit Milzbrandbacillen.

Eine Maus wird von einem Gehilfen mit der Mäusezange am Schwanz gefaßt und durch den durchlochten Deckel soweit in ein Mäuseglas hinein gehängt, daß nur noch der Schwanz und die Partie über der Schwanzwurzel außen sind. Nun schneidet der Untersucher die Haare an der Schwanzwurzel ab, hebt mit einer Pinzette die Haut in die Höhe, macht mit der Schere einen Schnitt so groß, daß die Öse eben hineingeht und lockert mit der spitzen Branche der Schere die Haut von dem Unterhautzellgewebe. Dann nimmt er mit der Platinöse (vorher ausglühen!) von einer Milzbrandkultur (ganz oberflächlich streichen!) soviel, daß die Öse halb ausgefüllt ist und bringt dies in die Wunde. —

Öse ausglühen! Die Maus wird losgelassen und vorsichtig ein anderer Deckel aufgesetzt.

Sterilisieren von Kartoffeln und Milch. — Kartoffeln werden geschält und die „Augen“ ausgeschnitten, dann in 1 cm hohe Scheiben zerlegt und in sterile kleine Glasschalen gelegt. Sterilisieren in einem Kessel im Dampfkochtopf 1 Stunde. — Ferner wird frische Milch in Reagenzgläser gebracht (in jedes etwa 10 cm) und mitsterilisiert.

3. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien. b.

1. Makroskopische Betrachtung der Platten.

Zunächst werden je 6—10 Gelatine und Agarröhrchen verflüssigt und schräg gelegt, so daß der Nährboden nach dem Erstarren $\frac{2}{3}$ der einen Wand des Röhrchens bedeckt. Auf den bei 37° gehaltenen Agarplatten haben sich zahlreiche Kolonien entwickelt; ist kein Wachstum erfolgt, so ist meist der Grund, daß man die Plattnöse noch heiß in die Jauche getaucht hatte. Beim schrägen Draufsehen findet man, daß sie teils auf dem Agar, teils in der Tiefe sitzen. Erstere sind mit wenigen Ausnahmen größer. Sie sind meist rund, die Oberfläche teils glatt, teils rauh, grau, graugelb, gelb, vielfach mit einem tieferliegenden Punkt in der Mitte, da die meisten oberflächlichen Kolonien erst in der Tiefe gewachsen und dann nach oben durchgebrochen sind. Sind die oberflächlichen Kolonien auffallend groß (5 cm) und dünn mit verwachsenen Rändern oder strichförmig, so kann die Ursache sein, daß sich Kondenswasser auf dem Agar niedergeschlagen hat. — Die tiefliegenden sind rund, wetzsteinförmig, baumförmig verästelt etc. Auf der zweiten und dritten Platte sind entsprechend weniger Kolonien; zur weiteren Untersuchung verwendet man eine Platte, auf der sich die meisten Kolonien nicht berühren.

Auf den bei 23° gehaltenen Agar- und Gelatineplatten sind höchstens sehr kleine Kolonien zu erkennen, da die Temperatur einer schnellen Entwicklung weniger günstig war.

2. Betrachtung bei 60facher Vergrößerung. Der Deckel einer Platte wird abgenommen und diese offen unter das Mikroskop gesetzt. Blende bei gutem Tageslicht 1—2 mm. Das Aussehen der Kolonien ist nach Farbe und Form sehr verschieden. Sie sind farblos bis dunkelbraun; fein granuliert, grob granuliert, mit Auflagerungen. Besonders ist auf den Rand zu achten, der glatt, granuliert, zerfetzt, mit Ausläufern sein kann. Erscheinen die Kolonien unscharf, so ist meist die Ursache, daß sich das Objektiv mit Wassertropfen beschlagen hat.

Auf den bei 22° gehaltenen Platten sind unter dem Mikroskop viele kleine Kolonien sichtbar (zuerst die Platte I betrachten!). Man verwechsle die Kolonien nicht mit den Kratzern, die in dem Glase oft benutzter Platten sind.

3. Betrachtung bei starker Vergrößerung. Man untersucht die Bakterien zunächst im lebenden Zustande im hängenden Tropfen von physiologischer Kochsalzlösung oder Bouillon. Der Tropfen wird wie am 2. Tage angefertigt und mit der Platinnadel (vorher ausglühen!)

eine Spur einer Bakterienkolonie hineingebracht, so daß er sich eben trübt. In dieser Weise werden mehrere verschieden aussehende Kolonien untersucht; die einzelnen Kolonien werden auf der Rückseite der Platte mit Tinte numeriert. Besonders ist auf den Rand des Tropfens zu achten. Man sieht in jedem Tropfen nur eine einzige Bakterienart (Zweck des Plattengießens). Teils sind es Coccen, teils Bazillen, teils Spirillen (sehr kleine Kolonien). Bei den Coccen achtet man auf die Größe und die Lagerung, bei den Bazillen außerdem noch auf die Bewegung. Diese kann fehlen (vgl. das oben über Molekularbewegung gesagte) oder vorhanden sein und ist dann langsam oder schnell, schlängelnd, wackelnd etc. Manche Bacillen hängen zu zweien aneinander, andere sind zu Fäden ausgewachsen. Vereinzelte Stäbchen, die aufrecht stehen, haben den Anschein von Coccen.

Hierauf färbt man dieselben Kolonien mit 10fach verdünntem Karbolfuchsin, doch muß man die Kolonien, da sie eine zähe Masse bilden, in einem Tröpfchen Wasser auf dem Deckglas verreiben. Die richtige Größe des Tröpfchens erhält man, wenn man die Spitze der Platinnadel unter einen starken Wasserstrahl hält. Man achtet wieder auf Gestalt, Größe und Lagerung, bei den Bacillen u. a. darauf, ob sie direkt aneinander liegen oder zwischen allen sich ein Zwischenraum befindet, da letzterer auf das Vorhandensein einer Hülle schließen läßt. Letztere kann auch die Bacillen als schwach gefärbter Saum umgeben. Im übrigen soll der Untergrund ganz klar sein: hat er sich mitgefärbt, so ist dies ein Zeichen, daß man zu tief in den Agar gekommen ist.

4. Fortzüchten der Bakterien. Von 3 oder 4 der bezeichneten Kolonien wird je auf schrägen Agar und auf schräge Gelatine abgeimpft, indem man mit der ausgeglühten und wieder abgekühlten Platinöse die Kolonie leicht berührt, und nach Öffnung des Röhrchens (Wattestopfen in der Hand behalten; Röhrchen schräg halten!) einen oberflächlichen Längsstrich macht. Ferner werden Agar- und Gelatinekulturen in der Weise angelegt, daß man die Kolonie mit der ausgeglühten und abgekühlten Platinnadel leicht berührt und in das betreffende Röhrchen einen Stich in die Mitte genau nach unten führt. Der Strich soll nicht ganz bis auf den Boden gehen. Beim Herausziehen der Nadel achtet man darauf, ob in der Gelatine ein kleines oberflächliches Loch geblieben ist, das ev. zur Verwechslung mit Verflüssigung Anlaß geben könnte. Ferner sieht man nach kurzer Zeit nach, ob die Gelatine längs des Stiches in ganzer Breite einen Sprung bekommen hat; dies kommt dann vor, wenn die Gelatine schon etwas eingetrocknet war; das Röhrchen ist zu verwerfen und dafür in ein anderes ein neuer Stich anzulegen, doch muß dieses zuerst verflüssigt werden und wieder erstarren. Die Kulturen sind mit der Nummer der Kolonie, Datum, Nährboden zu bezeichnen, die Agarkulturen bei 37°, die Gelatinekulturen bei 22° aufzubewahren.

5. Übung des Abimpfens dicht stehender Kolonien („Fischen“). Man stellt unter dem Mikroskop eine Kolonie ein, die nahe bei anderen liegt und kann nun in zweierlei Weise vorgehen.

a) Entweder man hebt den Tubus und sucht mit der Platinnadel die Kolonie zu berühren. Die Kolonie liegt meist etwas näher bei dem Untersucher, als dieser anfänglich anzunehmen pflegt. Glaubt man sie getroffen zu haben, so senkt man den Tubus wieder und sieht nach. Wurde die Kolonie getroffen, so ist ihre Form zerstört. Ist außer der gewünschten noch eine andere berührt, so ist das Resultat unbrauchbar.

b) Oder man sucht, während man ins Mikroskop sieht, mit der Nadel unter das Objektiv zu gehen und die Kolonie zu treffen. Zu beachten ist, daß sich das Bild hierbei umkehrt, daß also z. B. die Nadel statt von rechts von links kommt. Weder eine andere Kolonie noch der Tubus darf berührt werden; andernfalls ist das Resultat unbrauchbar.

Die erste Abimpfung ist auf schrägen Agar zu impfen, erst die zweite zu färben, damit, im Falle die zweite mißlingt, wenigstens einwandfreies Material zur weiteren Untersuchung vorhanden ist (Stammkultur). Die Platten werden wieder in die entsprechenden Brutschränke zurückgestellt.

II. Übung: Milzbrand. b.

Die Maus zeigt noch keine Krankheitserscheinungen; höchstens ist geringes Ödem an der Infektionsstelle vorhanden. Andere Symptome pflegen erst kurz vor dem Tode einzutreten, wenn die Bacillen den ganzen Körper überschwemmen. Sollte sie schon tot sein, so ist sie, wie in II. Übung angegeben, zu obduzieren und zu untersuchen, oder, falls keine Zeit dazu ist, mit einer Öse Blut eine neue zu infizieren.

Nochmaliges Sterilisieren der Kartoffeln und der Milch wie vorher.

4. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung der Bakterien. c.

1. Auf den bei 37° gehaltenen Agarplatten haben sich die Kolonien vergrößert; außerdem sind neue zum Vorschein gekommen. Auch kann es sein, daß eine Kolonie die ganze Platte überwuchert hat und sie als grauer Schleier bedeckt.

Auf den bei 23° gehaltenen Agarplatten ist das Wachstum heute besser, doch erreicht es nicht das der ersteren. Treten farbige Kolonien auf, so ist darauf zu achten, ob die Kolonie selbst gefärbt ist oder ob von ihr aus ein Farbstoff in die Umgebung diffundiert.

Auch auf den Gelatineplatten ist reichlicheres Wachstum erfolgt. Viele Kolonien haben die Gelatine in mehr oder minder großer Ausdehnung verflüssigt. Von einer solchen Kolonie darf man nur dann abimpfen, wenn man sich überzeugt hat, daß nicht noch andere Kolonien in der Verflüssigungszone liegen. — Auch sonst haben die Kolonien ein anderes Aussehen als auf Agar. Untersuchen bei 60facher Vergrößerung, im hängenden Tropfen und gefärbt!

Auf den Agarstrichkulturen ist durchweg Wachstum erfolgt, teilweise nur auf dem gemachten Strich, teilweise die ganze Oberfläche bedeckend eventuell mit kleinen Kolonien am Rande. Farbe, Aussehen etc. wie auf der Platte. Unten befindet sich Kondenswasser (keine Verflüssigung! Agar wird niemals verflüssigt!); man halte das Röhrchen nicht schräg, damit es nicht über die Kolonien läuft.

Bei den Stichkulturen ist Wachstum an der Oberfläche und im Stichkanal zu unterscheiden. Bei den Agarstichkulturen entspricht das Aussehen der Oberfläche dem der Plattenkolonie; der Stichkanal ist fadenförmig, perlschnurartig, mit Höckern, mit Ausläufern. Nach unten ist das Wachstum schwächer, da weniger Material dorthin gekommen

und außerdem weniger Sauerstoff vorhanden ist. Manchmal sind im Agar Gasblasen zu sehen.

Bei dem Gelatinestich ist der Belag ähnlich dem des Agarstiches, oder die Gelatine ist verflüssigt (vergl. aber das oben bei dem Anlegen des Stiches erwähnte über Sprung und Loch!) Die Verflüssigung kann sich auf den Stichkanal fortsetzen und trichter-, schalen- und sackförmig sein.

Ist die ganze Gelatine mit Kolonien durchsetzt, so kommt dies meist daher, daß der Stich gemacht wurde, bevor die Gelatine völlig erstarrt war; die Kultur ist dann unbrauchbar.

II. Übung: Milzbrand. c.

Die Milzbrandmaus ist eingegangen: sollte sie moribund sein, so tötet man sie, indem man ihr mit einer Pinzette die Halswirbelsäule zerquetscht.

Sie wird mit einer Pinzette aus dem Glase geholt, auf eine Holzplatte auf den Rücken gelegt und mit starken Nadeln an den möglichst weit abgezogenen Extremitäten festgesteckt. Die Instrumente werden ausgekocht — je mehr es sind, desto besser. Bei der Sektion sollen die Instrumente möglichst oft gewechselt werden: mindestens muß die Durchtrennung der Haut, die Öffnung des Leibes und die Herausnahme der Organe mit verschiedenen Scheren und Pinzetten vorgenommen werden. Niemals dürfen die Instrumente auf den Tisch gelegt werden, da sonst der Tisch infiziert und die Instrumente mit fremden Keimen verunreinigt werden. — Die Maus wird nun mit 60% Alkohol übergossen, damit keine Haare davonfliegen, dann die Haut über der Symphyse mit der Pinzette emporgehoben, eingeschnitten und nun bis zum Kehlkopf ein Längsschnitt gemacht, an den sich je ein Entspannungsschnitt zur Ansatzstelle der vorderen Extremitäten anschließt. Die Haut wird von Brustkorb und Bauchmuskulatur zurückpräpariert, die Instrumente gewechselt. Die Bauchmuskulatur wird in gleicher Weise bis zum Proc. xiphoidens durchtrennt und zwei Entspannungsschnitte nach den Seiten hin gemacht; von deren Ende bis zum oberen Ende des Hautschnittes die Rippen rechts und links durchschnitten, das Zwerchfell abgelöst und der vordere Teil des Brustkorbes nach oben geklappt. — Außer der Vergrößerung der Milz und einer allgemeinen Hyperämie werden anatomische Veränderungen nicht gefunden. Weiße Mäuse haben schon normalerweise große Milzen. Herde in der Leber sind meist durch Coccidien oder Taenien verursacht. Nun faßt man Trachea und Ösophagus ganz oben, durchschneidet sie, löst die Brustorgane heraus und legt sie in eine sterile Petrischale. Die Leber wird ebenfalls an den Bändern hinten oben gefaßt und in toto herausgenommen, ebenso Milz und Nieren. Dann werden die Instrumente ausgekocht, die Nadeln abgeglüht, die Leiche vernichtet (z. B. in ein Gefäß mit roher konz. Schwefelsäure geworfen), das Holzbrettchen abgebrannt.

Vor der weiteren Untersuchung legt man die Hälfte der Lunge, Leber, Milz und eine Niere zur Anfertigung von Schnittpräparaten zur Seite.

Untersuchung des Blutes und der Organe. a) Im hängenden Tropfen bei starker Vergrößerung. Man bringt mit der Nadel etwas Herzblut in ein Tröpfchen physiologische Kochsalzlösung. Man sieht: besonders am Rand des Tropfens zwischen zahlreichen, schon

stechapfelförmig gewordenen Blutkörperchen längere oder kürzere Bacillen-fäden, meist nicht völlig wagerecht liegend, so daß man sie erst durch Drehen mit der Mikrometerschraube ganz verfolgen kann. Eigenbewegung fehlt. — Dann wischt man das Zedernöl ab und untersucht bei 60facher Vergrößerung, bei der die Bacillen noch eben sichtbar sind.

b) Im gefärbten Deckglaspräparat. Eine Öse Blut wird auf ein Deckglas gebracht und mit der leicht gebogenen Nadel mit möglichst wenigen Strichen ausgebreitet. — Organe faßt man mit der Pinzette, schneidet sie mit der Schere durch und streicht mit der angeschnittenen Stelle einmal über ein Deckglas. Trocken werden lassen, in der Flamme fixieren, mit verdünntem Karbolfuchsin färben.

Fig. 5. Milzbrandbazillen. Ausstrich aus der Leber. 800:1.

Man sieht (Fig. 5): Ziemlich große Bacillen, meist in kurzen Ketten liegend; die Ecken sind rechtwinklig abgestumpft. Die Ketten sind von einem ungefärbten Hofe umgeben. Fäden sind nicht mehr zu sehen; sie werden durch die Färbung in ihre einzelnen Glieder aufgelöst. Nur wenn man die Präparate stark überfärbt, sieht man sie noch, da sich dann die Kapsel mitfärbt. Die Enden sind dann vielfach bambusförmig aufgetrieben. Auch die Kapsel kann noch von einem hellen Hofe umgeben sein, der beim Fixieren durch Schrumpfung der umgebenden Eiweißstoffe entstanden ist (Retraktionshof). Vereinzelte Bacillen färben

sich nicht mehr; diese waren bereits abgestorben. — Sporen sind nicht zu sehen, da sie im Tierkörper nicht gebildet werden. — Außer den Bakterien sind die Zellkerne stark, die roten Blutkörperchen schwach gefärbt; beim Ausstreichen werden manchmal Zellkerne zu Fäden ausgezogen und können zu Verwechslungen Anlaß geben. Kleine intensiv gefärbte Kugeln sind meist Farbstoffniederschläge; sie sind von Coccen durch ihre ungleichmäßige Größe zu unterscheiden.

Gramsche Färbung (ist dazu keine Zeit mehr, so können Deckglasausstriche fixiert aufbewahrt werden). Färben mit Anilinviolett 3 Minuten. Abspülen mit Wasser, Jodlösung 1 Minute; ablaufen lassen, tropfenweise 96 % Alkohol darübergießen, bis das Präparat eben farblos geworden ist. Trocknen. Zedernöl. — Ein anderes Präparat wird nach der Entfärbung in Alkohol mit 3 % Safraninlösung $\frac{1}{2}$ Minute nachgefärbt. Abspülen in Wasser, trocknen, Zedernöl. Man sieht: die Bacillen sind intensiv violett gefärbt; die Enden sind jetzt mehr rund. In dem nachgefärbten Präparate haben die Zellkerne die Gegenfarbe angenommen. Die Bacillen müssen gleichmäßig gefärbt sein, nicht nur gefärbte Körnchen zeigen, sonst war die Entfärbung zu lange oder die Farblösung zersetzt.

Einige Deckglasausstriche werden fixiert aufbewahrt.

c) Kulturelle Untersuchung. Würde man aus den Organen sofort Stichkulturen anlegen, so würde man vielleicht verunreinigte Kulturen erhalten, da fremde Bacillen bei der mikroskopischen Be-

trachtung übersehen sein könnten. Man gießt daher wieder Platten und zwar Agar- und Gelatineplatten wie vorher beschrieben. Zur Einsaat nimmt man für den Agar eine Öse Herzblut, für die Gelatine ein ebensogroßes Organstückchen (an der Wand des Röhrchens gut verreiben!). Außerdem legt man eine Kultur im hängenden Tropfen an, indem man ein Bouillontröpfchen mit einer Spur (Nadelspitze) Herzblut infiziert. (Gut mit Vaseline abschließen!) Dieses und die Agarplatten werden bei 37°, die Gelatineplatten bei 23° aufbewahrt.

d) Anfertigung von Schnittpräparaten. Die dafür reservierten Organe werden in 10% Formalinlösung (= 4% Formaldehydlösung) gelegt. (Im Dunkeln aufbewahren, da sich das Formalin im Lichte zersetzt!)

e) Ferner wird ein Agarröhrchen verflüssigt, in eine Petrischale ausgegossen und in den Brutschrank gestellt (vergl. II. Übung d 5). Nochmaliges Sterilisieren der Kartoffeln und der Milch wie vorher.

5. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien. d.

Die Kolonien auf den Platten haben sich vermehrt und vergrößert; ev. ist jetzt die erste Gelatineplatte vollständig verflüssigt.

Auch in den Stich- und Strichkulturen hat das Wachstum zugenommen, bei manchen Stichen ist Bildung von Ausläufern etc. dazugegetreten.

Die Platten und die Reagenzglaskulturen werden in die Brutschränke zurückgestellt.

II. Übung: Milzbrand. d.

1. Auf den Agarplatten sind viele gleichartige Kolonien sichtbar: die oberflächlichen sind pelzig rauh mit unscharfem Rand, bei den tiefliegenden sind die Ausläufer stärker ausgebildet als die eigentliche Kolonie. Eventuelle vereinzelte oberflächliche runde Kolonien sind Verunreinigungen durch Luftkeime.

Bei 60facher Vergrößerung (Fig. 6) sieht man die einzelnen Fäden, die der Kolonie ein wellig gerundetes Aussehen geben; die wellige Zeichnung ist auch im Innern zu sehen. Die Fäden liegen nicht durcheinander, sondern parallel. Vom Rande gehen zahlreiche Ausläufer aus, die aber sämtlich wieder zur Kolonie zurückkehren. Oft erscheinen die Fäden nicht homogen, sondern zeigen dunkle Punkte (Sporen). Die tiefliegenden Kolonien erscheinen dunkler und bestehen fast ganz aus wurstförmigen, zopfförmigen etc. Figuren mit zahlreichen auslaufenden Fäden.

2. Untersuchung bei starker Vergrößerung. Im hängenden Tropfen (Bouillon oder physiol. Kochsalzlösung) sind zahlreiche Fäden zu sehen, die entweder homogen sind oder zahlreiche stark lichtbrechende Punkte tragen. Diese sind entweder klein (Vorstadien von Sporen) oder nehmen die ganze Breite des Fadens ein (reife Sporen). Manchmal sind sie auch aus diesem schon herausgefallen. Eigenbewegung der Fäden fehlt; die Sporen können lebhaft Molekularbewegung zeigen.

Färbung von Ausstrichpräparaten mit Fuchsin. Eine Spur einer Kolonie wird mit etwas Wasser nicht zu stark auf dem Deckglas verrieben und mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt (Fig. 7). Die Bacillen erscheinen zu langen Ketten angeordnet: sie sind entweder gleichmäßig gefärbt oder es sind ungefärbte Lücken vorhanden (Sporen).

Färbung nach Gram. Das in gleicher Weise angefertigte Ausstrichpräparat zeigt ein analoges Bild.

Anfertigung eines Klatschpräparates. Ein gereinigtes Deckglas wird einmal durch die Flamme gezogen und auf die Platte gelegt, so daß eine Oberflächenkolonie in der Mitte liegt. Ganz leichtes Andrücken mit der Pinzette. Nach 1 Minute wird es wieder mit der Pinzette aufgehoben, während man es auf der anderen Seite mit einer Nadel stützt, damit es sich nicht verschiebt. Nun klebt die Kolonie am Deckglas. Man läßt sie lange antrocknen ($\frac{1}{2}$ Stunde), fixiert in der Flamme und färbt. Betrachten bei schwacher und starker Vergrößerung. Die Bacillen sind in der Lage erhalten, die sie in der Kolonie hatten. Ganz tadellose Klatschpräparate von Milzbrandbacillen erhält man nur, wenn der Agar sehr trocken war.

Fig. 6. Milzbrandkolonien auf der Agarplatte. 40:1.

Fig. 7. Milzbrandbacillen. Ausstrich aus einer 24stündigen Agarkultur. 800:1.

3. Betrachtung der Kultur im hängenden Tropfen. Zunächst überzeuge man sich, ob die Vaseline noch abschließt und der Tropfen nicht eingetrocknet ist. Bei schwacher Vergrößerung Aussehen wie eine tiefliegende Plattenkolonie. Bei starker Vergrößerung sieht man zwischen vereinzelt degenerierten Blutkörperchen Fäden mit meist sehr schöner Sporenbildung. Eventuell sind auch zahlreiche kurze Stäbchen oder Coccen sichtbar, die zufällig hineingekommen sind und die Kultur unreinigt haben.

4. Gelatineplatten. Mit dem bloßen Auge ist fast nichts zu sehen. — Man nimmt Platte I und stellt Organstückchen u. ä. ein, an deren Rand man Fäden findet. Geht man weiter nach der Seite, so findet man kleine Kolonien, die aus Konvoluten von Fäden bestehen.

5. Sporenfärbung. Wurden im hängenden Tropfen viele große Sporen gesehen, so macht man die Sporenfärbung; andernfalls impft man auf die seit gestern im Brutschrank gestandene Agarplatte, da auf diesem unterdessen trockener gewordenen Nährboden stets gute Sporenbildung stattfindet, und färbt nach 24 Stunden, nicht später, da sonst die

meisten Sporen schon aus den Fäden herausgefallen sind. — Wie sich vorhin gezeigt hat, färben sich die Sporen nicht mit den gewöhnlichen Farbstoffen. Man muß zuerst ihre widerstandsfähige Haut mazerieren, was am besten mit 5% Chrmsäure geschieht. Die Einwirkungs-dauer muß in jedem Falle ausprobiert werden. Man fertigt daher 5 Deckglaspräparate an (trocknen, fixieren) und bedeckt sie mit der Chrmsäure, läßt diese 1, 3, 5, 10, 15 Minuten einwirken und spült mit Wasser ab. Dann bedeckt man sie mit unverdünntem Karbolfuchsin (Ziehlsche Lösung), erhitzt 1 Minute bis zum Kochen, spült mit Wasser ab und entfärbt 5 Sekunden mit 5% Schwefelsäure. Abspülen mit Wasser, nachfärben mit Löffler-schem Methylenblau $\frac{1}{2}$ Minute. Die Sporen erscheinen rot in den blauen Fäden. (Fig. 8.)

Fig. 8. Milzbrandbazillen. Ausstrich einer 24stündigen Agarkultur. Sporenfärbung 800:1.

Kapselfärbung. Einer der gestern fixierten Organausstriche wird auf Kapseln gefärbt. Die Färbung geschieht entweder mit 2% wäßriger Methylviolett-lösung bis zur Dampfbildung. Abspülen mit Wasser, dann mit Essigsäure 6—10 Sekunden, oder mit 3% wäßriger Safraninlösung bei Zimmertemperatur 3 Minuten; abspülen mit Wasser; untersuchen in Wasser, d. h.: nicht trocknen, sondern sofort auf den Objektträger legen. Oberseite abtrocknen. Zedernöl darauf. Bacillen rot, Kapseln gelb. — An der Reinkultur können keine Kapseln gefärbt werden.

Anlegen von Kulturen aus den oberflächlichen Plattenkolonien: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Einimpfen in Bouillon, Ausstreichen auf Kartoffel (1 oberflächlicher Strich). Die Gelatinekultur wird bei 23°, die übrigen bei 37° aufbewahrt.

Die in Formalin fixierten Organe werden 24 Stunden in fließendem oder oft gewechseltem Wasser ausgewaschen; damit die Lunge nicht davonschwimmt, bindet man sämtliche Organe in Gaze ein.

III. Übung: Methoden zur Differentialdiagnose zwischen zwei nahe verwandten Bakterienarten: Typhus und Coli. a.

Steht von einer Sektion ein Stück Typhusmilz zur Verfügung, so wird sie im gefärbten Deckglaspräparat und im hängenden Tropfen untersucht. Man findet darin mittelgroße Stäbchen, einzeln oder zu zweien, nach Gram unfärbbar. Außerdem findet man, wenn die Milz nach dem Tode längere Zeit gelegen hat, verunreinigende Bakterien, Coccen, große Stäbchen etc. darin. Dann gießt man Gelatineplatten mit einigen Ösen davon. — Steht keine Typhusmilz zur Verfügung (Typhusstuhl ist hier nicht brauchbar), so gießt man die Gelatineplatten aus einer Reinkultur. Man nimmt davon mit der Öse nur ganz wenig ab: an der Öse darf kaum etwas zu sehen sein. — Ferner werden aus normalem Stuhl Gelatineplatten gegossen (3 Ösen Stuhl in das erste Röhrchen). Auch der Stuhl wird vorher im gefärbten Ausstrichpräparate untersucht; er besteht zum großen Teil aus Bakterien, meist Stäbchen.

6. Tag.

II. Übung: Milzbrand. e.

Die Kolonien auf den Agarplatten sind größer (man verwechsle nicht damit Verunreinigungen, die vielleicht beim Anfertigen des Klatschpräparats daraufgekommen sind); bei schwacher Vergrößerung Aussehen wie gestern.

Auf den Gelatineplatten (nicht schräg halten!) sind sehr viele graue Kolonien zu sehen, die verflüssigt haben. Unter dem Mikroskop sieht man, daß sie aus vielen durcheinanderliegenden Fäden bestehen.

Der Gelatinestich zeigt an der Oberfläche Verflüssigung; der Belag ist in das dadurch entstandene Loch eingesunken. Der Stichkanal ist noch ziemlich schwach entwickelt und zeigt kleine Höcker.

Der Agarstich zeigt einen granen pelzigen Belag mit unscharfen Rändern; der Stichkanal kleine Höcker und Perlen.

Der Agarstrich hat das Aussehen des Belages des Stiches.

Die Bouillonkultur hat das Aussehen von in Flüssigkeit schwimmender Watte; meistens liegen die Bazillen auf dem Boden, und es wachsen einige Fäden in die Höhe; niemals ist Häutchenbildung zu bemerken. Auf der Kartoffel hat sich an der Stelle, über die der Strich geführt ist, ein matter Belag entwickelt.

Untersuchung der Schrägagar- Bouillon- und Kartoffelkultur im hängenden Tropfen oder gefärbten Deckglaspräparat.

Sporenfärbung, wenn nicht schon gestern vorgenommen (vorher im hängenden Tropfen auf Sporen untersuchen).

Die Schrägagarkultur wird in die Sammlung aufgenommen; damit sie sich besser konserviert, wird sie zugeschmolzen. Man schneidet den Wattestopfen kurz ab, brennt ihn oben ab, schiebt ihn etwas in das Röhrchen und übergießt ihn mit verflüssigtem Paraffin, das der Erstarrungstemperatur nahe ist. Die Kulturen halten sich zugeschmolzen sehr lange; doch darf man alte Kulturen nicht direkt abimpfen, sondern muß sie erst mit Bouillon übergießen und 24 Stunden in den Brutschrank stellen.

Die in Wasser ausgewaschenen Organe kommen in 60% Alkohol.

III. Übung: Typhus und Coli. b.

Auf der ersten Typhusgelatineplatte sind sehr zahlreiche kleine graue Punkte zu sehen. Bei 60facher Vergrößerung erscheinen die oberflächlichen Kolonien zart, durchsichtig mit gewelltem glatten Rande; aus der Mitte ziehen Linien gegen den Rand zu (Weinblattzeichnung), Fig. 9). Die tiefliegenden Kolonien sind etwas gelblich, rund, im Innern grob granuliert. Öfters kommt es vor, daß die Kolonien sehr zahlreiche Ausläufer zeigen, oder daß sie ganz aus derartigen Schwänzchen bestehen. Die Ursache ist entweder, daß die Platten bis zu hoher Temperatur aufbewahrt wurden, oder daß die Gelatine zu stark alkalisch war. Die Übung ist dann zu wiederholen.

Man sucht die Platte aus, von der man am leichtesten isolierte Kolonien abimpfen kann, und untersucht eine davon im hängenden Tropfen resp. im gefärbten Deckglaspräparat (mit einem Tropfen Wasser) oder wenn die Kolonie zu klein sind, im gefärbten Klatschpräparate. Man sieht: Stäbchen und Fäden in lebhafter Eigenbewegung; auch im ge-

färbten Präparate erscheinen die Fäden (im Gegensatz zu den Milzbrandbazillen) nicht als Ketten. Das gefärbte Präparat ist aufzubewahren. Ferner impft man einige Oberflächenkolonien unter Benutzung des Mikroskops auf schrägen Agar.

Dann sucht man auf den aus dem Stuhl gegossenen Platten Kolonien, die den Typhuskolonien sehr ähnlich sehen (eventuell etwas größer sind) und impft einige davon nach mikroskopischer Untersuchung auf schrägen Agar. Aufbewahrung im Brutschrank.

Aufertigung von Schnittpräparaten aus einer Typhusmilz. Die Typhusbacillen bilden in der Milz (auch Leber, Niere) kleine Häufchen; damit diese deutlicher sichtbar werden, wird ein Stück des Organes in sublimatgetränkte Tücher eingeschlagen und 24 Stunden bei Zimmertemperatur liegen gelassen (Anreicherung), dann Stücke davon fixiert und eingebettet. Für das folgende müssen derartige Blöcke schon vorhanden sein.

Fig. 9. Typhuskolonie auf Gelatine. 40:1.

Fig. 10. Häufchen von Typhusbacillen in der Milz. Schnittpräparat 800:1.

Das Schneiden soll mit dem Mikrotom geschehen. Mit dem Rasiermesser Schnitte anzufertigen, die dünn und dabei groß genug sind, ist sehr schwierig; doch kann es im Notfalle ebenfalls versucht werden. Die Blöcke werden mit verflüssigtem Paraffin auf einen Holzblock aufgeklebt und fest in der Klammer des Mikrotoms fixiert. Die Schnittstärke soll etwa $15\ \mu$ betragen. Splittert das Paraffin, so ist es vor jedem Schnitt anzuhäuten; auch kann man das Messer erst einige Zeit in den Brutschrank legen; außerdem sind die Schnitte während des Schneidens mit einem Pinsel zu stützen, damit sie sich nicht zu stark rollen. Dann werden sie in Xylol übertragen. Zerfasern sie sich darin, so klebt man sie lieber auf Deckgläser durch Kapillarattraktion auf, indem man sie auf warmes Wasser (etwa 40°) legt, wo sie sich glatt legen, dann mit einem Deckglas von unten aufhebt und auf Filtrierpapier für mindestens 4 Stunden (besser über Nacht) in den Brutschrank legt. Die weitere Behandlung geschieht wie bei den anderen Schnitten (Xylol, abs. Alkohol etc.).

Mehrere Schnitte werden mit der Platinnadel (nicht Öse) vom Xylol in absolutem Alkohol (2 Min.), 96 und 60 % Alkohol gebracht und dann 15—30 Minuten in unverdünntes Karbolfuchsin (vorher filtrieren) gelegt;

hierauf in Wasser abgespült und in 96 % Alkohol, dem auf 10 Teile ein Teil 2 % Essigsäure zugesetzt sind, so lange differenziert, bis sie einen weinroten Farbton angenommen haben. Der Anfänger wird am besten nach verschieden langer Zeit je einen Schnitt herausnehmen. Dann kommen sie in 96 % Alkohol 1 Min., absoluten Alkohol 1 Min., Xylol 2 Min. Um sie aus diesem herauszunehmen, schiebt man ein Stückchen Klosettpapier darunter, legt sie darauf glatt, überträgt sie auf den Objektträger, drückt leicht an und hebt das Papier ab. Bedecken mit Kanadabalsam oder Zedernöl und Deckglas.

Man sieht: bei schwacher Vergrößerung zwischen den stark gefärbten Zellkernen einzelne rote Flecken, größer als jene, aber nicht so scharf, sondern mehr verwaschen gefärbt. Diese stellt man bei starker Vergrößerung ein (die Blende weit öffnen). Sie bestehen aus Typhusbacillen, die besonders am Rande des Häufchens stark hervortreten. (Fig. 10.)

Der häufigste Fehler, der gemacht wird, ist der, daß die Schmitte zu stark entfärbt werden. In einem guten Präparate ist das Protoplasma fast farblos, die Zellkerne sind intensiv gefärbt.

Ferner wird eine Schrägagarkultur von Geflügelcholerabacillen angelegt.

7. Tag.

Vakat.

8. Tag.

I. Übung: Einfachste Methoden zur Erkennung und Isolierung von Bakterien. e.

Auf den Platten sind kaum mehr neue Kolonien aufgetreten. Dagegen sieht man in der Tiefe ähnlich gestaltete Gebilde, die bei 60facher Vergrößerung vieleckig, sargdeckelförmig, sternförmig oder baumförmig verästelt aussehen. Es sind dies Kristalle, die sich beim Trockenwerden des Agars ausgeschieden haben. Sie lösen sich, wenn man eine Öse voll Salzsäure dazufügt. — Man betrachte sich die Kristalle genau, damit man sie nicht späterhin mit tiefliegenden Kolonien verwechselt.

Die Platten können dann beseitigt werden, ebenso die anderen Kulturen, nachdem man sie nochmals betrachtet hat. Man legt sie zu diesem Zweck in einen emaillierten Topf, bringt, wenn er zu dreiviertel voll ist, ebensohoch Wasser dazu und kocht ihn aus.

II. Übung: Milzbrand. f.

Die Organe kommen in 96 % Alkohol.

III. Übung: Typhus und Coli. c.

1. Die Kolonien auf den Gelatineplatten haben sich vergrößert; die Colikolonien sind deutlich größer als die Typhuskolonien. Die Zeichnung im Innern der Oberflächenkolonien ist vielfach verschwunden.

— Von den Oberflächenkolonien werden Klatschpräparate angefertigt und gefärbt. Man sieht im Zentrum S- und schlingenförmige Zeichnungen; der Rand wird aus langen Stäbchen und Fäden gebildet (Fig. 11), die zum Zentrum zurückkehren, wodurch die Kolonie einen lappigen Bau hat.

2. Auf den Agarstrichen hat sich ein grauer Belag gebildet, der bei Coli etwas dicker als bei Typhus ist. — Im hängenden Tropfen sieht man kleine Stäbchen mit sehr lebhafter Eigenbewegung. Im gefärbten Deckglaspräparate (verdünntes Karbolfuchsin) erscheinen sie etwas kleiner als die auf Gelatine gewachsenen. (Fig. 12.) Bei der Färbung nach Gram und Nachfärbung mit Safraninlösung nehmen sie die rote Farbe an, sind also nach Gram unfärbbar.

3. Man gießt aus einer Typhus- und einer Colikultur je 3 Agarplatten (ganz wenig Material nehmen); ferner legt man aus je einer Typhus- und je drei Colikulturen folgende Kulturen an: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Gelatinestrich, Kartoffel, Milch und Lackmusmolke (in letztere eine ganze Öse Kultur). Außerdem fertigt man Schüttelkulturen in Zuckeragar an, indem man in die verflüssigten und wieder abgekühlten Röhren eine Öse Kultur einbringt, dann aber nicht ausgießt,

Fig. 11. Typhuskolonie auf Gelatine.
Klatschpräparat. 800:1.

Fig. 12. Typhusbacillen aus einer
Agarkolonie. 800:1.

sondern den Nährboden im Reagenzglase erstarren läßt. Gleichzeitig verflüssigt man weitere vier Röhren mit Zuckeragar, bringt in jedes einen Tropfen Neutralrot (konz. wäss. Lösung), kocht noch kurze Zeit, läßt abkühlen und verfährt ebenso. — Außerdem impft man von der Typhuskultur und den drei Colikulturen in je zwei Bouillonröhren. — Sämtliche Kulturen außer den Gelatinekulturen kommen in den Brutschrank.

IV. Übung: Untersuchung einiger anderer pathogener Mikroorganismen: Geflügelcholera- und Schweinerotlaufbacillen. a.

Mit einer Öse der Geflügelcholerakultur wird eine Maus subkutan oder eine Taube in den Brustmuskel (nach Abrupfen der Federn an der betreffenden Stelle) geimpft.

Ferner ist eine Schrägagarkultur von Schweinerotlaufbacillen anzulegen.

9. Tag.

II. Übung: Milzbrand. g.

Die Organe kommen in absoluten Alkohol.

III. Übung: Typhus und Coli. d.

Die Kolonien auf den Gelatineplatten haben sich nicht wesentlich verändert; die Platten können beseitigt werden.

Auf den Agarplatten sind oberflächlich breite, graue, in der Tiefe wetzsteinförmige Kolonien gewachsen; die Colikolonien sind wenig üppiger als die Typhuskolonien. Bei 60facher Vergrößerung bietet das Wachstum im Gegensatz zu den Gelatineplatten nichts Charakteristisches. In einem gefärbten Klatschpräparat sieht man, daß die Bazillen regellos durcheinanderliegen. Im hängenden Tropfen zeigen sie lebhaftere Eigenbewegung. — Die Bouillonkulturen sind gleichmäßig getrübt. — Der Gelatinestich und der Gelatinestrich zeigt einen irisierenden Belag; der Nährboden ist nicht verflüssigt. Im Stichkanal ist das Wachstum gering und nimmt nach unten ab. — Der Agarstich zeigt nichts Charakteristisches; er hat einen Belag und einen Stichkanal mit Höckern, in gleicher Weise, wie man dies bei vielen anderen Bakterienarten sieht.

Die Milch hat der Typhusbacillus unverändert gelassen (höchstens hat sich spontan oben eine Rahmschicht gebildet), der Colibacillus hat sie zum Gerinnen gebracht. — Auf der Kartoffelkultur von *B. coli* wächst längs des Impfstiches ein gelbbrauner Belag; auf der von *B. typhi* scheint beim ersten Anblick kein Wachstum erfolgt zu sein. Impft man jedoch mit einer Nadel ganz oberflächlich von dem Impfstrich oder seiner Umgebung ab, so bemerkt man, daß auch hier ein fast unsichtbares Wachstum stattgefunden hat. Im gefärbten Deckglaspräparate von der Kartoffelkultur zeigen die Typhusbacillen oft ungefärbte Stellen, die aber nicht mit Sporen identisch, sondern durch Plasmolyse entstanden sind; d. h. das Protoplasma hat sich nach den Rändern zurückgezogen, so daß diese allein den Farbstoff annehmen.

Im Zuckeragar hat der Typhusbacillus nur eine Trübung hervorgerufen, der Colibacillus hat große Gasblasen gebildet, die den Agar zerrissen haben; letzterer hat ferner in dem Neutralrotagar den Farbstoff zersetzt (reduziert), so daß die Kultur im auffällenden Lichte grün, im durchfallenden hellrot aussieht. — Sollte diese Farbe nicht deutlich hervortreten, wartet man noch einen Tag, verflüssigt dann den Agar durch Kochen und fügt etwas Alkali dazu. Unzersetztes Neutralrot wird dann orange, zersetztes grün fluoreszierend.

In der Lackmusmolke ist bei dem Typhusbacillus fast kein Wachstum zu bemerken; sie ist schwach rot, es wurde also nur wenig Säure gebildet; der Colibacillus hat sie hellrot gefärbt und stark getrübt.

Hat man Typhusserum oder kann man Blut von einem Typhuskranken oder -rekonvaleszenten erhalten, so legt man je eine Schrägagarkultur von Typhus und Coli an und entnimmt im letzteren Falle dem Patienten durch Einstich in das Ohrfläppchen etwas Blut, das man in einem schmalen, sterilen Gläschen zum Gerinnen bringt.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. b.

Die mit Geflügelcholeraabazillen geimpfte Maus oder Taube ist eingegangen; man geht bei der Sektion und der weiteren Untersuchung vor wie bei der Milzbrandmaus. Von den Deckglasaussstrichen wird einer in der bisher geübten Weise nach dem Trockenwerden in der Flamme fixiert und mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt; einige andere werden nach dem Trockenwerden mit Ätheralkohol (Äther und absoluter Alkohol zu gleichen Teilen) übergossen und damit 5 Minuten stehen gelassen, getrocknet und kurz gefärbt. Man sieht: in dem in der Flamme fixierten Präparate viele sehr kleine Stäbchen, oft zu zweien zusammen; in den mit Ätheralkohol fixierten Präparaten sind sie nur an den beiden Enden gefärbt (bipolar) (Fig. 13). Hierdurch haben sie Ähnlichkeit mit dem (etwas größeren) Pestbacillus, mit dem Bacillus der Geflügelcholera nahe verwandt ist. Die Blutkörperchen der Vögel sind kernhaltig.

Fig. 13. Geflügelcholeraabazillen im Blute einer Taube. 800:1.

Bei der Färbung nach Gram und Nachfärbung mit Safranin nehmen die Bacillen die letztere Farbe an, sind also nach Gram anfärbbar.

Aus dem Herzblut oder den Organen werden Agar- und Gelatineplatten gegossen; ein Teil der Organe wird in 10% Formalinlösung eingelegt.

Mit einer Öse der gestern angelegten Schweinerotlaufkultur wird eine Maus subkutan infiziert.

10. Tag.

II. Übung: Milzbrand. h.

Die Milzbrandorgane werden in Paraffin oder Celloidin¹⁾ eingebettet, steht kein Mikrotom zur Verfügung, so fällt dieser Teil der Übung aus. Das Einbetten geschieht in folgender Weise: Die Organe bis zur Größe einer Mäuseleber kommen für 2 Stunden in das „1. Xylol“ (100 cem), dann für 2 Stunden in das „2. Xylol“ (100 cem); das Xylol kann lange

1) Celloidineinbettung ist für bakteriologische Zwecke weniger zu empfehlen: das Anfertigen dünner Schnitte ist schwerer und manche Farbstoffe färben das Celloidin mit. — Man schneidet das Celloidin in kleine Würfel und macht sich zwei Lösungen in Äther — Alkohol (Äther + abs. Alkohol zu gleichen Teilen): die eine von der Konsistenz eines dicken Syrups, die andere, indem man erstere auf die Hälfte verdünnt. — Die Organe kommen vom abs. Alkohol auf 24 Stunden in Ätheralkohol, ebensolange in die dünne und einige Tage in die dicke Celloidinlösung. Dann werden sie auf einen Kork gesetzt, Celloidin darüber gegossen und langsam (einige Stunden) unter einer Glasglocke trocknen gelassen. Aufbewahrung in 80% Alkohol. Empfehlenswert ist, sie einige Tage in einer Mischung von 80% Alkohol 1 Teil, Glycerin 6 Teile zu härten. — Beim Schneiden muß das Messer in einem möglichst spitzen Winkel stehen und stark mit 80% Alkohol angefeuchtet werden.

Zeit benutzt werden. Unterdessen stellt man das Paraffinschränken auf 53—55° ein, was ohne besondere Vorrichtung leicht zu erreichen ist, wenn die Temperatur des Zimmers nicht zu stark schwankt, und bringt 2 Schälchen mit Paraffin hinein, das aus hartem und weichem Paraffin (von 48 resp. 58° Schmelzpunkt) je nach der Jahreszeit im Verhältnis von 2:1 bis 1:1 gemischt wird. In jedem bleiben die Organe zwei Stunden. Dann bestreicht man ein nicht zu flaches Uhrschränken sehr dünn mit Glycerin, legt die Organe hinein, übergießt sie mit Paraffin und läßt sie zur schnellen Abkühlung auf Wasser schwimmen, bis die Oberfläche erstarrt ist, worauf man sie untertaucht. Nach 2 Stunden nimmt man sie heraus und kann durch Fingerdruck leicht den Block aus dem Uhrschränken entfernen.

III. Übung: Typhus und Coli. e.

Die Besichtigung der am 8. Tage angelegten Typhus- und Colikulturen ergibt eine Vergrößerung der meisten, sonst keine wesentliche Veränderung. Die Hälfte der 8 am 8. Tage angelegten Bouillonkulturen wird auf Indolbildung untersucht: Coli bildet Indol, Typhus nicht. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß sich aus Indol und salpetriger Säure ein roter Farbstoff bildet. Man macht sich eine ganz schwache Nitritlösung, d. h. 0,5 Natriumnitrit in 1000 Wasser (nimmt man zu viel Nitrit, so entsteht ein braungelber Farbstoff, der durch die Eigenfarbe der Bouillon verdeckt wird), und bringt davon einige Tropfen, sowie 1 cem 25% Schwefelsäure in jede Bouillonkultur. Tritt dann noch keine Rotfärbung auf, so kocht man die Flüssigkeit (nur dünnwandige Reagenzgläser dürfen über der Flamme erhitzt werden) und beobachtet dann bis nach dem Erkalten. Ist sie auch dann noch nicht vorhanden, so macht man die Probe 5 Tage später mit den übrigen Kulturen.

Ist Typhusserum vorhanden, oder hat man Blut von einem Typhuskranken oder -rekonvaleszenten erhalten, so macht man die Agglutinationsprobe: andernfalls wird sie erst am 48. Tage der Übungen mit selbsthergestelltem Serum vorgenommen. — Man fertigt sich Verdünnungen des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:2000 an und zwar, wenn viel Serum zur Verfügung steht, mit der Pipette, wenn wenig, indem man das Serum mit einer abgewogenen Öse in die Kochsalzlösung bringt. Die Öse wird auf Bruchteile von Milligrammen genau gewogen und dann mit Wasser gefüllt, indem man das Gefäß schräg hält, die Öse eintaucht und sie in der Weise heraushebt, daß sie dabei wagerecht steht. Dadurch werden stets gleichgrosse Tropfen erhalten. Nun wiegt man sie nochmals; die Gewichtszunahme soll etwa 2 mg betragen; beträgt sie mehr als 2,5 mg, so muß die Öse verkleinert und nochmals gewogen werden. — Die Verdünnung geschieht in Reagenzgläsern; man macht sie, wenn der Inhalt der Öse z. B. 2,0 mg wiegt, indem man 10 Ösen Serum in 1,0, 5 Ösen in 1,0, 1 Öse in 1,0 etc. physiologische Kochsalzlösung bringt; jede Verdünnung wird zweimal gemacht. Dann verreibt man Typhus- resp. Colikultur von der Agaroberfläche hinein, soviel Ösen voll, als man Kubikzentimeter der Serumverdünnung genommen hat. Außerdem verreibt man die Kulturen in je 1 cem Kochsalzlösung ohne Serum. (Kontrolle). Die Flüssigkeit muß gleichmäßig getrübt sein; nur bei sehr starkem Serum gelingt eine gleichmäßige Verreibung nicht, da dann

sofort starke Agglutination eintritt. Von jeder Aufschwemmung wird ein hängender Tropfen angelegt (im ganzen 12). — Man sieht nun bei starker Vergrößerung, daß in den Kontrollen (Coli in Serumverdünnung und Kochsalzlösung und Typhus in Kochsalzlösung) lebhaft bewegliche Bakterien herumschwimmen; in den mit Typhusbazillen infizierten Serumverdünnungen dagegen tritt — je nach der Stärke des Serums bei grösserer oder geringerer Verdünnung — Agglutination ein. Einzelne Bacillen ballen sich zu kleinen Häufchen zusammen; andere, die vorbeischwimmen wollen, bleiben daran hängen und suchen sich zunächst noch loszureißen; die Haufen vergrößern sich immer mehr, bis schließlich einzelne Bacillen nur noch spärlich vorhanden sind. Bei stärkeren Verdünnungen desselben Serums sieht man nur kleine Häufchen; die meisten Bacillen sind frei. — Die Colibacillen dagegen werden von dem Typhusserum nicht agglutiniert. Hierauf wischt man den Zedernöltropfen vom Deckglas und betrachtet das Präparat bei schwacher Vergrößerung. Man sieht da, wo keine Agglutination vorhanden ist, den Tropfen fein granuliert (Einstellung zunächst nur auf den Rand des Tropfens); die agglutinierten Häufchen erscheinen als kleinere oder größere braungelbe Brocken. Auf diese Agglutination bei schwacher Vergrößerung ist besonders großer Wert zu legen.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. c.

Auf den Agarplatten haben sich zahlreiche kleine Kolonien entwickelt; die oberflächlichen sind rund und graugelb, gegen das Licht gehalten bläulich opalisierend; die tiefliegenden gelbgrau, wetzsteinförmig oder rund. Große Kolonien sind durch Kondenswassertropfen entstanden oder Verunreinigungen. — Bei 60facher Vergrößerung sind die oberflächlichen gelblich, durchscheinend und fein granuliert. Auf den Gelatineplatten sind die Kolonien mit dem bloßen Auge kaum zu erkennen; unter dem Mikroskop sind sie ähnlich den Agarkolonien, aber scharf-randig.

Anfertigung eines hängenden Tropfens aus einer Agarkolonie. Die Bacillen sind sehr klein und unbeweglich. Anfertigung eines gefärbten Klatschpräparats. Die Bacillen erscheinen wie in den Organen; bipolare Färbung ist sehr selten zu sehen. Sporen werden nicht gebildet. Anlegen folgender Kulturen: Gelatinestich, Gelatinestrich, Agarstich, Agarstich, Bouillonkultur, Schüttelkultur in Zuckeragar.

Auswaschen der in Formalin fixierten Organe in fließendem Wasser.

Die mit Schweinerotlauf infizierte Maus ist krank; ihre Augen sind verklebt.

II. Tag.

II. Übung: Milzbrand. i.

Die Organe werden in der früher beschriebenen Weise geschnitten, die Schnitte aufgeklebt oder unaufgeklebt weiter behandelt. Die Färbung geschieht teils wieder mit Karbolfuchsin, teils nach Gram. Im letzteren Falle kommen die Schnitte vom 60% Alkohol in Wasser, dann 3 Min. in Anilinviolett, Wasser, Jodlösung 1 Min., 96% Alkohol, bis keine Farbwolken mehr abgehen, absoluten Alkohol, Xylol, Kanada-

balsam. Zum Zwecke der Gegenfärbung wird nicht nach-, sondern vorgefärbt. Man bringt sie vom Wasser in Lithionkarmin 5—8 Min., dann ohne Zwischenspülung mit Wasser sofort in 1 % Salzsäurealkohol (60 % Alkohol mit 1 % Salzsäure) 5 Min., Leitungswasser (mehrmals wechseln) und färbt dann wie oben angegeben nach Gram. Man sieht (Fig. 14) nur in den Gefäßen sehr zahlreiche Milzbrandbacillen liegen. Anato-

Fig. 14. Milzbrandbacillen in einem Glomerulus.
Schnittpräparat. 800 : 1.

Fig. 15. Schweinerotlaufbacillen.
Ausstrich aus dem Blute einer
Maus. In der Mitte ein damit
vollgestopfter Leucocyt. 800 : 1.

mische Veränderungen sind nicht vorhanden, speziell keine Milzbrandpneumonie. — In den nur nach Gram gefärbten Präparaten sind die Bacillen dunkelviolet, das Gewebe ungefärbt; in denen mit Gegenfärbung die Bacillen dunkelviolet, die Kerne rot, das Protoplasma höchstens schwach rosa.

In schlecht entfärbten Grampräparaten sieht man außerdem dunkelviolette Farbstoffkristalle.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. d.

Geflügelcholera: Die Kolonien auf den Platten sind wenig vergrößert; ebenso die in den Agrarstich- und Strichkulturen. In den Gelatine- kulturen ist das Wachstum sehr gering geblieben, etwas besser ist es in der Bouillonkultur. In Zuckeragar wurde kein Gas gebildet.

Die Kulturen können sämtlich beseitigt werden; vorher legt man noch eine Agarstich- und Agarstrichkultur an, die man am nächsten Tage zusehmilt und der Sammlung einverleibt.

Schweinerotlauf: Die vorgestern infizierte Maus ist eingegangen und wird in derselben Weise wie die früheren obduziert. Anatomischer Befund: Vergrößerung der Milz. Man fertigt Deckglaspräparate an und fixiert und färbt mit verdünntem Karbolfuchsin. Man sieht ziemlich viele sehr kleine und besonders sehr dünne Stäbchen, so lang aber bedeutend schlanker als die Geflügelcholera-bacillen. Sie liegen einzeln oder zu zweien; außerdem finden sie sich in großen Haufen in den Leucocyten (Phagocytose) (Fig. 15). Vorbedingung für letzteres ist, daß die Zellen nicht zu sehr beim Ausstreichen geschädigt wurden. Anfertigung eines

Grampräparates mit Safraningegegnärfärbung: die Bacillen erscheinen dunkelviolett.

Aus den Organen werden Agar- und Gelatineplatten gegossen; der Rest wird in 10% Formalin eingelegt.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. a.

Um die häufigsten vorkommenden Verunreinigungen kennen zu lernen, legt man Luft- und Erdplatten an. Man gießt 3 Agar- und 3 Gelatineröhrchen in Petrischalen aus und läßt sie erstarren. Dann nimmt man den Deckel ab und läßt je eine an einem Ort mit reiner Luft, je eine andere an einem Ort mit staubiger (z. B. Stall der Versuchstiere) offen stehen. Die beiden anderen werden mit wenig fein zerriebener Erde bestreut und zwar ganz dünn, so daß die Partikelchen einen Abstand von mindestens 1 cm haben. Ferner schneidet man eine Kartoffel in Scheiben (vorheriges Sterilisieren nicht nötig) und bestreut sie mit etwas Henstaub. Dann legt man sie in einen Suppenteller, bringt auf den Boden vorher etwas mit Sublimatlösung befeuchtetes Filtrierpapier, damit sie nicht austrocknen, und deckt mit einem anderen Teller zu. Die Agarplatte und ein Teil der Kartoffelscheiben werden im Brutschrank, die Gelatineplatten und der andere Teil bei 23° aufbewahrt.

12. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. e.

Die gestern angelegten Kulturen von Geflügelcholera werden eingeschmolzen und bei niedriger Temperatur aufbewahrt.

Auf den Agarplatten von Schweinerotlauf haben sich zahlreiche kleine Kolonien entwickelt. Bei Betrachtung mit dem bloßen Auge erscheinen die oberflächlichen etwas trüber als die Geflügelcholerakolonien. Bei 60facher Vergrößerung sind sie durchscheinend gelblich und fein granuliert. Die tiefliegenden sind uncharakteristisch: meist wetzsteinförmig und braungelb. Im hängenden Tropfen sehen die Bacillen sehr klein und unbeweglich aus; im gefärbten Deckglaspräparat sind sie klein und schlank, nach Gram sind sie färbbar.

Aus oberflächlichen Kolonien werden angelegt: Agarstich, Agarstrich, Bouillon (sämtlich in den Brutschrank); Gelatinestich.

Auf den Gelatineplatten ist mit dem bloßen Auge noch nichts zu sehen. Bei 60facher Vergrößerung (Platte I nehmen!) sieht man oft schon an diesem Tage ganz kleine, meist drei- oder vieleckige Kolonien, oft mit feinen Ausläufern, was dem ganzen Bilde eine Ähnlichkeit mit Knochenhöhlen (Knochenkörperchen) gibt.

Die Gelatineplatten werden bei der gleichen Temperatur weiter aufbewahrt.

Die in Formalin fixierten Organe kommen für 24 Stunden in fließendes Wasser.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. b.

Auf sämtlichen Platten und Kartoffeln haben sich Kolonien entwickelt; auf den bei 23° aufbewahrten sind sie kleiner. Man untersucht

nun etwa 6 Kolonien, die sich durch ihre auffallende Beschaffenheit oder durch ihre Häufigkeit auszeichnen. Dabei geht man bei jeder einzelnen in folgender Weise vor: Betrachtung mit dem bloßen Auge; bei 60facher Vergrößerung. Untersuchung im gefärbten Deckglaspräparat; im hängenden Tropfen: Färbung nach Gram. Ausstreichen auf schrägen Agar (ist die Kolonie klein, so macht man dies zuerst, damit man eine zuverlässige Stammkultur hat); Agarplatten, Gelatineplatten gießen oder wenigstens Ausstreichen darauf. Agarstich, Gelatinestich, Bouillon, Kartoffel; ferner kann man einige der in Übung III angeführten differentialdiagnostischen Nährböden heranziehen. Man fertigt sich eine Tabelle an, in die senkrecht die Nummern der Kolonien, wagrecht das Aussehen, die Beweglichkeit, die Färbbarkeit nach Gram, das Wachstum auf den verschiedenen Nährböden etc. eingetragen werden. — Sorgfältig ist darauf zu achten, daß man nicht zwei nahe aneinander stehende Kolonien auf einmal abimpft. — Unter anderem suche man folgende Bakterien: Micrococcen (unregelmäßige Wuchsverbände); Sarcinen (Teilung nach 3 Dimensionen, Wuchsverband also würfel- oder paketförmig), Kolonien meist gelb; kurze Stäbchen; Kolonien von wurzelförmigem Aussehen, mikroskopisch lange Stäbchen (*Bac. mycoides*); Kolonien mit Wülsten und Falten, besonders auf Kartoffeln, mikroskopisch sporentragende Stäbchen (*Bac. mesentericus*); Schimmelpilzkolonien, deren dicke Ausläufer sich strahlenförmig nach allen Seiten erstrecken, makroskopisch meist erst nach einigen Tagen sichtbar.

13. Tag.

(Am besten wird mit Übung VI begonnen.)

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. g.

Auf den Gelatineplatten von Schweinerotlauf haben sich die Kolonien etwas vergrößert; die Gestalt ist noch ungefähr dieselbe.

Auf der Agarstichkultur ist ein Belag nur angedeutet; der Stichkanal zeigt Höcker, die Entwicklung ist in der Tiefe eben so gut wie oben. — Im Gelatinestich ist nur ein feiner Faden zu sehen. Die Agarstichkultur zeigt einen zarten Belag; die Bouillon ist gleichmäßig getrübt.

Die Organe werden in 60 % Alkohol gebracht.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. c.

Die gestern angelegten Kulturen werden genau betrachtet; bei den Schrägagarkulturen achtet man auf Geruch, auf Farbe, Glanz, Dicke des Belages (flach, erhaben: — glatt, rauh, wulstig, netzartig; — kreisrund, gezackt, mit Ausläufern, gelappt; glänzend, matt, irisierend, kreidig), auf Trübung des Kondenswassers und Häutchenbildung darauf. Dann werden die Kulturen mit der Lupe im durchfallenden Licht (gegen das Fenster zu) betrachtet: die rechte Hand, die die Lupe hält, kann man mit dem kleinen Finger an dem Reagenzglas stützen. Die Kolonien können klar durchscheinend, getrübt, undurchsichtig etc. sein. Bei den Stichkulturen achtet man auf Belag (wie oben) und Stichkanal (siehe auch I. Übung c); bei den Gelatinekulturen besonders auf Verflüssigung. Die Bouillon

kann sein: gleichmäßig getrübt, flockig getrübt, nur oben getrübt, mit einem oberflächlichen Häutchen, mit Bodensatz, von dem aus manchmal die Bakterien an den Wänden emporwachsen. Die Milch ist unverändert oder geronnen; im ersteren Falle sieht man im hängenden Tropfen zahlreiche Bakterien zwischen den Milchkörperchen herumschwimmen. Nach längerer Zeit wird die Milch von manchen Bakterien durchsichtig gemacht, indem das Casein gelöst wird und das Fett sich tropfenförmig an der Oberfläche abscheidet (Peptonisierung). Der Belag auf der Kartoffel wird ähnlich charakterisiert wie der auf Agar. Die Kulturen werden weiter bei derselben Temperatur aufbewahrt wie bisher.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. a.

Der Ausgangspunkt für die meisten Nährböden ist das Fleischwasser. — Man übergießt 2 Kilo gehacktes Rindfleisch (auch Pferdefleisch) in einem Kochtopf mit der doppelten Menge Wasser und kocht, indem man anfangs mit einem Glasstab gleichmäßig verrührt, 2 Stunden lang. — Das käufliche Hackfleisch ist in Großstädten manchmal mit Konservierungsmitteln versetzt, die entwicklungshemmend wirken würden. Auffallend hellrote Farbe auch bei längerer Aufbewahrung ist auf Sulfit verdächtig: man übergießt eine Portion mit 25% Schwefelsäure und achtet auf Geruch nach schwefliger Säure. — Zur Prüfung auf Borsäure kocht man etwas Fleisch mit schwacher Salzsäure und betupft mit dem Auszug Kurkumapapier: Rotfärbung, die nach dem Trocknen bestehen bleibt, zeigt Borsäure an. — Derartiges Fleisch ist unbrauchbar.

Das erhaltene Fleischwasser wird in einen Kolben oder Kochtopf gegossen einschließlich dessen, was sich aus dem Bodensatz in einem Tuche auspressen läßt, und mit Wasser auf 2 Liter ergänzt. Dann verteilt man es, indem man in ein Kölbchen 500, in zwei je 300, in vier je 200, in drei je 100 ccm bringt und sie mit Watteverschluß versieht.

1. Bouillon: zu einem Kölbchen mit 300 ccm setzt man 1% Pepton und $\frac{1}{2}$ % Kochsalz.

2. Zuckerbouillon: 100 ccm ebenso mit 1% Traubenzucker.

3. Gelatine: zu einem Kölbchen mit 200 ccm setzt man 1% Pepton, $\frac{1}{2}$ % Kochsalz und 10% (im Sommer 15%) Speisegelatine.

4. Agar: zu dem Kölbchen mit 500 ccm setzt man 1% Pepton, $\frac{1}{2}$ % Kochsalz und 2% fein zerschnittenen Stangenagar.

5. Glycerinagar: 100 ccm ebenso mit 5% Glycerin.

6. Zuckeragar: 300 ccm wie Agar mit 2% Traubenzucker.

7. Alkalische Gelatine: 200 ccm, einstweilen wie Gelatine.

8. Alkalischer Agar: 100 ccm wie Agar und

9. dreiprozentiger Agar: 100 ccm mit 1% Pepton, $\frac{1}{2}$ % Kochsalz und 3% Stangenagar.

10. Peptonstammmlösung: 5 Kölbchen mit je 100 ccm destilliertem Wasser, 10 g Pepton, 10 g Kochsalz, 0.1 g Kaliumnitrat und 0.2 g Soda.

Bouillon, Gelatine und Peptonstammmlösung werden im Dampftopf eine Stunde, der Agar am besten im Autoklaven bei 120° 30 Minuten sterilisiert, wobei sich die festen Bestandteile lösen. Steht kein Autoklav zur Verfügung, so stellt man den Agar erst eine halbe Stunde in den Dampftopf und kocht dann über der Flamme auf Asbestdrahtnetz bis zur Lösung mehrere Stunden.

Zur Gewinnung von Blutserum wird von einem Rind bei der Schlachtung das Blut in einem großen, sterilen Glaszylinder aufgefangen,

nach 2 Stunden der Blutkuchen mit einem sterilen Glasstab von der Wand abgelöst und das Gefäß an einem kühlen Ort aufbewahrt.

Für den übernächsten Tag sind 50 ccm frische Milch zu besorgen; ferner für denselben Tag tuberkulöses Sputum, für den 16. Tag Eiter aus Panaritium u. ä., nicht aus einem offenen Herd.

14. Tag.

Vakat.

15. Tag.

(Am besten wird mit Übung VI begonnen.)

III. Übung: Typhus und Coli. f.

Wenn die Indolreaktion am 10. Tage negativ war, wird heute nochmals in gleicher Weise (III. Übung. e) untersucht.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. g.

Auf den Gelatineplatten sind die Kolonien jetzt deutlich als kleine graue Pünktchen zu sehen, die die Gelatine mehr aufgezehrt als verflüssigt haben. Bei 60facher Vergrößerung sieht man von einem verfilztem Zentrum zahlreiche Fäden radiär ausgehen.

Die Gelatinestichkultur zeigt sehr geringes Oberflächenwachstum: vom Stichkanal gehen zahlreiche Fäden aus, besonders von einzelnen Punkten, so daß sich das Bild einer „Gläserbürste“ darbietet.

Die Organe kommen in 96% Alkohol.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. d.

Die Untersuchung der Keime wird fortgesetzt. Die am 12. Tage angelegten Kulturen werden betrachtet; steht eine Bestimmungstabelle zur Verfügung, so kann man die einzelnen Arten zu bestimmen suchen. Ferner werden einige neue Kolonien, die unterdessen auf den Platten zum Vorschein gekommen sind, in der früher angegebenen Weise mikroskopisch und kulturell untersucht. Auf einigen Platten sind Schimmel gewachsen: man macht daraus ebenfalls mikroskopische Präparate und vergleicht die Größe der Fäden mit der von Bacillen, die Größe der Sporen mit der von Coccen.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. b.

Neutralisieren der Nährböden. Zu den Nährböden 1—6 wird aus einer Bürette 10%ige Sodalösung so lange hinzugefügt, bis ein Tropfen rotes Lackmuspapier bläut und blaues rötet. (Den ganzen Streifen zur Kontrolle mit Wasser anfeuchten!) Bei den Nährböden 7—9 verfährt man ebenso und setzt dann noch auf 100 ccm 3 ccm der Sodalösung zu. Aus einem Kölbchen der PeptonstammLösung werden 30 ccm zu 270 ccm dest. Wasser gebracht (Peptonwasser). Dem Agar wird zur Klärung etwas rohes Hühnereiweiß zugesetzt und kräftig umgeschüttelt

und die sämtlichen Nährböden im Dampftopf $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht, (in der Zwischenzeit werden die Übungen III, IV und VII vorgenommen) und filtriert. Letzteres ist bei den Peptonlösungen unnötig; bei Bouillon und Gelatine gelingt es leicht; sollte die Gelatine nach dem Filtrieren noch trüb aussehen, so setzt man ebenfalls etwas rohes Hühnereiweiß hinzu, kocht und filtriert nochmals. Das Filtrieren des Agars geschieht im Dampftopf bei 100° durch ein einfaches weißes Faltenfilter; nur die obenstehende Masse wird in den Trichter gegossen, der Bodensatz weggeschüttet. Das Filtrieren dauert mehrere Stunden. Dann werden die Nährböden 1—9 auf ihre Reaktion geprüft, eventuell, wenn diese sauer geworden ist, nochmals neutralisiert und nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf gekocht. Gleichzeitig sterilisiert man einen Trichter zum Abfüllen mit, den man mit einem Gummischlauch und Quetschhahn und spitz auslaufenden Glasröhrchen versehen hat.

Dann füllt man mit Hilfe dieses Trichters die Nährböden in sterile Reagenzgläser ab, in jedes etwa 10 cm, in diejenigen Agarröhrchen, die schräg gelegt werden sollen, 5 cm. Einen Teil der Nährböden kann man auch fertig in den Kolben aufbewahren; die Peptonstammlösung muß jedenfalls in den Kölbchen bleiben. Die Nährböden werden darauf nochmals $\frac{1}{2}$ Stunde im Dampftopf gekocht.

Löfflersches Serum. Von dem Rinderserum kommen in eine größere Anzahl Reagenzgläser je 4 cm, dazu je 1 cm der Zuckerbouillon; dies läßt man schräg bei 100° erstarren und stellt es 2 Tage in den Brutschrank. Die Röhrchen, auf denen Kolonien wachsen, werden ausangiert.

Lackmusmolke. 50 cm Milch werden angewärmt und mit 1 cm 10 fach verdünnter Salzsäure versetzt; der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Sodalösung genau neutralisiert, 1—2 Stunden im Dampftopf gekocht und nochmals filtriert. Sollte die Flüssigkeit nicht klar werden, so ist noch mehrmals zu kochen und filtrieren, oder man läßt die Trübung sich absetzen und pipettiert die überstehende Flüssigkeit ab. Die Flüssigkeit muß ganz hell und schwach gelblich sein; braune Färbung beweist zu starke Alkaleszenz und macht sie unbrauchbar. — Dann setzt man 5 % Lackmuslösung zu. Der Nährboden erscheint violett; er wird abgefüllt (in jedes Röhrchen etwa 2 cm), und nochmals im Dampftopf sterilisiert.

VII. Übung: Tuberkulose. a.

Das Sputum wird in eine Petrischale geschüttet und zur Untersuchung die gelblichen Klümpchen herausgesucht. Eines wird auf ein kleines Deckglas gebracht und so lange mit der Platinöse über der kleinen Flamme des Brenners verrieben, bis das Präparat völlig lufttrocken ist; gerade in den letzten Momenten vor der Trocknung ist ein gleichmäßiges Verreiben am besten möglich. Nach dem Fixieren bedeckt man das Deckglas mit viel unverdünntem Karbolfuchsin, läßt es einmal aufkochen und zwei Minuten stehen. Dann legt man es in ein Glas mit 3 % Salzsäurealkohol (S 7), bis es nur noch einen ganz leichten rosa Ton hat, spült mit Wasser ab und färbt kurz mit Methylenblau nach. — Die Tuberkelbacillen erscheinen als rotgefärbte, schlanke, manchmal leicht gekrümmte Stäbchen, etwa wie Schweinerotlaufbacillen; die übrigen Bakterien (man achte genau auf Diplo- und Streptococcen) und das Gewebe sind blau gefärbt.

Mit einem Teile des Sputums wird ein Meerschweinchen intraperitoneal infiziert. Das Tier wird gewogen und das Gewicht notiert. Dann kocht man eine Spritze zu 5 cm mit abgestumpfter Spitze aus, füllt sie, schneidet ihm, während es von einem Gehilfen gehalten wird, die Haare an einer Stelle des Bauches ab, macht einen Schnitt, der nur die Haut durchdringt und so klein ist, daß die Kanüle eben hineingeht, führt sie 1 cm tief zwischen Haut und Muskulatur ein, richtet sie dann senkrecht auf und geht mit leichtem Drehen und Drücken in die Bauchhöhle ein. An einem Ruck merkt man, daß man darin angelangt ist, injiziert 1 cm und verklebt die Wunde mit Collodium. — Auskochen der Spritze.

Wurden mikroskopisch viele Streptococcen gesehen, so hebt man das Sputum an einem kühlen Orte für den nächsten Tag auf.

16. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. h.

Die Organe kommen in absoluten Alkohol.

V. Übung: Keime in Luft und Erde. e.

Untersuchung und Fortzüchtung der Bakterien in der angegebenen Weise.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. c.

Die Nährböden 1—11 werden nochmals im Dampftopf $\frac{1}{2}$ Stunde sterilisiert.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. a.

Staphylococcen: Der Eiter wird zunächst mit verdünntem Karbolfuchsin, Methylenblau und nach Gram gefärbt. Man sieht, wenn man Staphylococceneiter vor sich hat, zwischen den Leucocyten zahlreiche unregelmäßig gestaltete Häufchen von Coccen (Fig. 16); öfters sind zwei Individuen nur durch eine feine Linie von einander getrennt; doch findet man niemals Bildung von Ketten. Dagegen können manchmal Staphylococcen im Eiter als Diplococcen erscheinen. Im Grampräparate erscheint die Zahl der Coccen noch bedeutend größer. — Dann untersucht man den Eiter im hängenden Tropfen; die Coccen sind hier schwer von Fetttröpfchen, Granulationen im Inneren der Leucocyten etc. zu unterscheiden. — Dann werden mit je einer Öse Agar- und Gelatineplatten gegossen.

Streptococcen erhält man aus Eiter, Erysipel, tuberkulösem Sputum oder von den Tonsillen auch vieler gesunder Personen. Auch sie erscheinen im mikroskopischen Präparate vielfach als Diplococcen. Zur

Fig. 16. Staphylococcen im Eiter.
800:1.

kulturellen Untersuchung gießt man einige Röhren Agar in Petrischalen und bestreicht sie längere Zeit nach dem Erstarren oberflächlich mit dem Material.

Ferner sind Tmpfer zur Entnahme vom diphtherieverdächtigem Material anzufertigen. Man schneidet einen kräftigen Draht in Stücke, die länger als ein Reagenzglas sind, unwickelt das eine Ende mit Watte, steckt dieses in ein Reagenzglas, verschließt es mit einem Wattestopfen und sterilisiert im Trockenschrank.

17. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. i.

Die Organe werden eingebettet.

VI. Übung: Nährbödenbereitung. d.

Die Nährböden 1—11 werden nochmals im Dampftopf $\frac{1}{2}$ Stunde sterilisiert und sind dann gebrauchsfertig.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. b.

Auf den aus dem Eiter gegossenen Agarplatten haben sich zahlreiche hellgelbe Kolonien entwickelt. Die oberflächlichen sind rund, die tiefliegenden wetzsteinförmig. Bei 60facher Vergrößerung erscheint der Rand grobgranuliert. — Im hängenden Tropfen sieht man viele Coccen ohne bestimmte Lagerung zu einander meist einzeln und ohne Eigenbewegung, höchstens lebhaft Molekularbewegung ist zu bemerken. Im gefärbten Deckglaspräparat (Färbung mit Fuchsin und nach Gram) liegen sie ebenfalls regellos durcheinander (Fig. 17); oft bemerkt man eine eben vollzogene Teilung, was sich dadurch kundgibt, daß zwei Coccen besonders nahe an einander liegen und an der betreffenden Seite etwas abgeplattet sind.

Auf den Gelatineplatten ist das Wachstum noch sehr gering; man sieht bei 60facher Vergrößerung kleine runde Kolonien.

Aus oberflächlichen Agarkolonien werden folgende Kulturen angelegt: Agarstich, Agarstrich, Bouillon (37°), 2 Kartoffeln (22 und 37°), Gelatinestich (22°). Die Agarplatten werden weiter bei 37° aufbewahrt.

Auf den Streptococcenplatten sind außer den gewünschten Bakterien, wenn man von unreinem Material ausgegangen ist, selbstverständlich noch andere gewachsen. Die Streptococcenkolonien sind sehr zart und können bei 60facher Vergrößerung zweierlei Aussehen haben: entweder sie sind rund und in der Mitte und am Rande fein granuliert, oder sie haben eine Zeichnung, die aus gewundenen Linien besteht, ähnlich der Milzbrandkolonie auf Agar, und radiär angesendete Ansläufer. Im hängenden Tropfen sieht man perlschnurähnliche unbewegliche Ketten von Kokken. Im gefärbten Deckglaspräparat (Fuchsin und Gram) hat man dasselbe Bild. Oft sieht man, daß in der Kette je zwei Coccen sich einander näher liegen. — Sie werden auf folgende Nährböden überimpft: Agar — Stich und Strich; Bouillon: Kartoffel (37°); Gelatinestich (22°).

IX. Übung: Diphtherie. a.

Ist es möglich, Diphtheriematerial von einem Kranken zu erhalten, so wird dieses untersucht. Man streicht mit dem Wattetupfer über die erkrankte Stelle und fertigt zunächst Deckglaspräparate an, die man mit Methylenblau und nach Gram färbt. — Die Diphtheriebacillen erscheinen als Stäbchen, größer als Typhusbacillen, in der Mitte oder an einem Ende verdickt oder zugespitzt, oft gekrümmt, manchmal etwas verzweigt

Fig. 17. Staphylococcen.
Reinkultur auf Agar. 800:1.

Fig. 18. Diphtheriebacillen. Aus-
strich von einer Membran. 800:1.

meist sind einzelne Stellen in ihnen ungefärbt. (Fig. 18.) Die Färbung nach Gram ist positiv, wenn nicht zu lange entfärbt wird. — Außerdem sind in den Präparaten noch andere Bakterien zu sehen, gegen die die Diphtheriebacillen an Zahl oft bedeutend zurücktreten.

Kulturen werden nur auf Löfflerschem Serum angelegt, indem man mit dem Tupfer über 3 Röhrchen wegstreicht. Aufbewahrung im Brutschrank.

Steht kein Material von Kranken zur Verfügung, so legt man eine Kultur auf Löfflerschem Serum aus einer Reinkultur an.

18. Tag.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. c.

Die Staphylococcenkolonien auf den Agarplatten haben eine dunklere, orangegelbe Farbe angenommen und sich vergrößert. Auf den Gelatineplatten sind sie schon mit dem bloßen Auge gut zu erkennen; sie zeigen gelbe Färbung und einen Verflüssigungshof. Bei dichter Besäung ist die erste Platte vollständig verflüssigt. Bei 60facher Vergrößerung erscheinen sie rundlich und grobkörnig. — Die Agarstichkultur hat einen geringen dunkelgelben Belag; der Stichkanal ist uncharakteristisch. Auf dem Agarstrich ist starkes Wachstum erfolgt; am Rande sind viele einzelne Kolonien zu sehen. Die Bouillon ist gleichmäßig getrübt. Im Gelatinestich ist das Wachstum noch gering, die Oberfläche läßt Verflüssigung erkennen. Auf der Kartoffel hat sich ein orangegelber Belag gebildet.

Das Wachstum der Streptococcen ist bedeutend kümmerlicher, bei der Agarstichkultur im Stichkanal besser als an der Oberfläche, im Gelatinestich in einzelnen kleinen Knötchen im Stichkanal ohne Ver-

flüssigung, in der Bouillon am Boden und von da an der Wand hinauf. — Besser ist das Wachstum, falls man mit *Strept. pyog. brevis* arbeitet, den man aber aus obigem Ausgangsmaterial selten erhält: das Wachstum ist dann üppig, die Gelatine wird verflüssigt, die Bouillon ist gleichmäßig getrübt, doch findet man bei mikroskopischer Betrachtung nur kurze Ketten von 3–4 Gliedern.

Die Staphylococcen- und die Streptococcenbouillon werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Präparate aus Bouillonkulturen sind nicht über der Flamme, sondern in abs. Alkohol 2 Minuten lang zu fixieren. Man findet in der Staphylococcenbouillon, wenigstens solange sie jung ist, keine dichten Haufen, sondern meist einzeln oder zu zweien liegende Coccen. In der Streptococcenbouillon haben sich Ketten gebildet, die die von der Agarkultur stammenden an Länge bedeutend übertreffen (Fig. 19).

Mit den Staphylococcen wird ein Kaninchen intravenös, ein anderes auf die Cornea infiziert. — Zur intravenösen Injektion nimmt man am besten die Kartoffelkultur: ist der Belag noch zu dünn, so wartet man

Fig. 19. Streptococcen.
Bouillonkultur. 800:1.

Fig. 20. Diphtheriebacillen. Ausstrich
von Löfflerschem Serum. 800:1.

noch einen oder einige Tage. — Man kratzt 3 Ösen voll davon ab, wobei man darauf sieht, daß man ganz wenig von der Oberfläche der Kartoffel mitnimmt, da die Coccen dann im Tierkörper besser haften. Diese werden in 3 cem steriler physiologischer Kochsalzlösung sehr fein verrieben, dann 1 cem herausgenommen und mit 9 cem Kochsalzlösung verdünnt. — Dann wird eine Spritze zu 1 oder 5 cem ausgekocht und zunächst mit der letzteren Verdünnung gefüllt. — Außerdem ist zum Versuche eine Schere zum Abschneiden der Haare und eine Pinzette notwendig.

Ein links von dem Untersucher stehender Gehilfe faßt das Tier mit beiden Händen am Kopfe und fixiert diesen, indem er gleichzeitig die Augen zuhält: zwischen seinem linken Unterarm und seinem Körper hält er den Rumpf des Tieres, ohne fest zu drücken. Der Untersucher schneidet zunächst die Haare über dem Rande der Seite des Ohres ab, führt durch Druck an der Wurzel des Ohres eine Stauung herbei und sticht dann in eine Randvene fast parallel mit dieser ein. In diesem Momente muß der Gehilfe darauf gefaßt sein, daß das Tier den Kopf zurückzieht. — Glaubt der Untersucher in der

Vene zu sein, so dringt er durch leichtes Drehen vor, bis wenigstens die Hälfte der Kanüle eingedrungen ist. Dann wird das Ohr senkrecht gestellt und durch leichten Druck 1 ccm injiziert. Hält man das Ohr gegen das Licht, so sieht man, wie die farblose Flüssigkeit in der Vene hinunterfließt; beim Aufhören des Druckes kehrt das Blut sofort zurück. — Luftembolie ist sorgfältig zu vermeiden. Eine Schwellung darf nicht entstehen: sie beweist, daß die Injektion in das umgebende Bindegewebe stattgefunden hat. Auch dann wird die Vene blutleer, doch nur an der Stelle, wo die Kompression durch die Flüssigkeit stattfindet. — Ist die Flüssigkeit injiziert, so komprimiert man die Vene unterhalb der Einstichstelle und zieht die Kanüle heraus. — Dann wird ein anderes Kaninchen mit der unverdünnten Aufschwemmung in gleicher Weise infiziert.

Zur cornealen Infektion kokainisiert man zunächst das Auge eines dritten Kaninchens, macht sich eine dritte Aufschwemmung (fünf Ösen der Agarstrichkultur in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung) in einem sterilen Reagenzglas, nimmt die Kanüle von der Spritze, taucht sie in die Flüssigkeit, faßt die Bindehaut des Auges, sobald die Cornea unempfindlich geworden ist, mit einer feinen Pinzette am Cornealrand und sticht ganz schräg in die Cornea ein, indem man die Ausflußöffnung der Kanüle nach der Cornea wendet. Von der Spitze soll 1 mm eindringen. Durchbohren der Cornea ist sorgfältig zu vermeiden. — In derselben Weise wird das andere Auge infiziert.

Die Spritze zu 1 ccm wird dann mit einer abgestumpften Kanüle versehen und ausgekocht, und einer Maus 0,2 ccm der vorher kräftig umgeschüttelten Streptokokkenbouillon intraperitoneal injiziert. Ein Gehilfe hält das Tier mit der linken Hand an der Haut des Nackens, mit der rechten an den Hinterbeinen. Der Untersucher schneidet zuerst die Haare an einer Stelle $\frac{1}{2}$ —1 cm oberhalb der Symphyse ab und macht dann mit der Schere einen ganz kleinen, kaum sichtbaren Schnitt, der eben die oberen Schichten der Haut durchdringt. Dann führt er die Spritze durch Drehen und leichtes Drücken ein, bis er an einem kleinen Ruck merkt, daß er in der Bauchhöhle angelangt ist, und injiziert. Beim Herausziehen darf keine Flüssigkeit zurücktreten.

IX. Übung: Diphtherie. b.

Auf den Serumröhrchen, die aus Material von Diphtheriekranken angelegt wurden, sind verschiedenartige Kolonien gewachsen. Die Diphtheriebacillenkolonien sind groß, mattglänzend, doch nicht porzellanartig weiß. Auch wenn die Kolonien sehr dicht stehen, fallen die der Diphtheriebazillen besonders auf. Man impft mit einer Nadel ab und fertigt ein mit Löfflerschem Methylenblau gefärbtes Ausstrichpräparat und einen hängenden Tropfen an. In ersterem (Fig. 20) erscheinen die Diphtheriebacillen wieder als große, keulenförmig verdickte (*Corynebacterium*) Stäbchen: sie nehmen stellenweise den Farbstoff nicht an. Besonders charakteristisch ist ihre Lage: sie bilden meist einen Winkel miteinander, mehrere zusammen liegen wie gespreizte Finger. — Im hängenden Tropfen sieht man, daß sie unbeweglich sind. — Ein weiteres Präparat wird nach Neisser gefärbt: nach der Fixierung mit einer Mischung der essigsauren Methylenblaulösung (2 Teile) mit der Kristallviolettlösung (1 Teil) 1 Sekunde (s. S. 7); abspülen mit Wasser; Chrysoidinlösung 3 Sekunden; Wasser. Man sieht in den braungefärbten Bacillen zahlreiche dunkelblaue Körnchen liegen.

Da man selbst bei isoliert liegenden Kolonien nicht mit absoluter Sicherheit sagen kann, daß man eine Reinkultur vor sich hat, gießt man aus einer Kolonie, die man mikroskopisch als Diphtheriekolonie erkannt hat, Glycerinagarplatten und streicht auf andere ausgegossene Glycerinagarplatten oberflächlich aus.

19. Tag.

IV. Übung: Geflügelcholera und Schweinerotlauf. k.

Die Organe werden in der früher besprochenen Weise geschnitten und mit Fuchsin, die Schweinerotlaufschnitte auch nach Gram mit Gegenfärbung gefärbt; eventuell vorher wieder aufgeklebt. (Gleichzeitig wird das Diphtheriematerial geschnitten, s. IX. Übung c). Man sieht in den Gefäßen sehr zahlreiche kleine Bacillen liegen. Beim Schweinerotlauf ist auch sehr lebhafte Phagocytose zu bemerken.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. d.

In den Kulturen ist das Wachstum, in den Gelatinekulturen auch die Verflüssigung fortgeschritten. Die intravenös injizierten Kaninchen machen öfters schon an diesem Tage einen kranken Eindruck; manchmal lassen sich ophthalmoskopisch Blutungen nachweisen. Ist eines davon eingegangen, so sind die pyämischen Herde höchstens ganz klein. Man obduziert dann das Tier wie vorher die Maus und sucht mikroskopisch und kulturell nach Staphylococcen.

Auf der Cornea des anderen Tieres ist ein Ulcus entstanden; gleichzeitig ist mehr oder minder starke eitrige Konjunktivitis zu beobachten. Der Eiter wird mikroskopisch auf Staphylococcen untersucht. Dann tötet man das Tier durch Chloroform oder Nackenschlag. In letzterem Falle hebt man es mit der linken Hand an den Hinterbeinen auf und versetzt ihm mit der Kleinfingerseite der rechten Hand einen kräftigen Schlag in den Nacken. Ein Knacken zeigt an, daß die Wirbelsäule luxiert ist. Der vordere Teil des Tieres ist sofort bewegungslos, die Hinterbeine machen noch kurze Zeit schnellende Bewegungen. Vermutet man, daß das Tier nur betäubt ist, so öffnet man beiderseits die Pleura mit der Schere. Dann werden beide Augen enukleiert und in 10% Formalinlösung gelegt.

IX. Übung: Diphtherie. c.

Auf den Glycerinagarplatten sind Diphtheriebacillen allein oder mit anderen Bacterien vermischt gewachsen. Die Diphtheriebacillenkolonien sind durchscheinend, hell, mit netzförmiger Zeichnung und sehr grob granuliertem Rande (Fig. 21). Die tief-liegenden sind rund oder wetzsteinförmig, dunkler, grob granuliert. Einige der Kolonien, die man für Diphtherie hält, werden unter dem Mikroskope abgeimpft (I. Übung b), gefärbt und untersucht. Findet man Diphtheriebacillen, so legt man folgende Kulturen an: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Löfflersches Serum.

Fig. 21. Diphtheriecolonien auf Glycerinagar. 24 Stunden alt. 40:1.

Sollte die Reinzüchtung Schwierigkeiten machen, so impft man von einer Diphtheriekolonie des ersten Serumröhrchens auf ein anderes Serumröhrchen und gießt am nächsten Tage von da aus nochmals Platten.

Die Diphtherieschnitte werden teils mit Fuchsin, teils nach Gram unter Vorfärbung mit Lithionkarmin gefärbt. Am besten klebt man sie auf und nimmt die Färbung erst am nächsten Tage vor. Man sieht: Vom normalen Epithel sind nur noch Reste vorhanden. An seiner Stelle liegen Pseudomembranen, aus Netzen von (ungefärbtem) Fibrin, das bis in die Mucosa reicht, und zahlreichen Leucocyten bestehend: in und auf den Pseudomembranen finden sich zahlreiche Gruppen der großen, kolbig angeschwollenen Diphtheriebacillen. Auch andere Bakterien, speziell Coccen, liegen darauf. Die Schleimhaut unter der Membran ist kernreich, zellig infiltriert, die Gefäße sind strotzend mit Blut gefüllt. Will man das Fibrin färben, so nimmt man die Weigertsche Färbung vor (XI. Übung b). Weitere Einzelheiten sind an der Hand eines Lehrbuchs der pathologischen Histologie zu studieren.

20. Tag.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. e.

Die Kulturen können nach nochmaliger Betrachtung beseitigt werden, bis auf je eine, die zugeschmolzen und aufbewahrt wird. — Da sich die Zeit des Todes des intravenös injizierten Kaninchens nicht genau angeben läßt, sei hier folgendes bemerkt: Wird es tot gefunden, so geschieht die Obduktion in der s. Z. für Mäuse beschriebenen Weise. Man findet in den Organen, oft erst mit der Lupe, pyämische Herde, die mikroskopisch und kulturell zu untersuchen sind. Bei anscheinend negativem Befund ist besonders die Marksubstanz der Niere zu untersuchen, in der man auch dann noch öfters „Ausscheidungsherde“ findet. — Einige der Herde werden herausgeschnitten und in Formalin fixiert.

Die fixierten Bulbi werden in Wasser 24 Stunden ausgewaschen.

IX. Übung: Diphtherie. d.

Die Oberflächenkulturen auf den Glycerinagarplatten zeigen einen stark zerrissenen Rand; mikroskopisch findet man jetzt (und noch häufiger an den folgenden Tagen) verzweigte Formen. Das Wachstum in der Agarstich- und Agarstrichkultur ist gering, noch kümmerlicher das in der Gelatinestichkultur. Dagegen ist auf Löfflerschem Serum üppiges Wachstum erfolgt. Aus einer der Kulturen werden 3 Bouillonkulturen angelegt; man hält das zu infizierende Röhrchen ziemlich senkrecht und impft an den Rand der Oberfläche, um womöglich die Bildung eines oberflächlichen Häutchens zu erzielen.

Steht ein choleraähnlicher Vibrio zur Verfügung, so wird davon eine Agarstrichkultur angelegt; andernfalls ist Wasser zur Isolierung zu besorgen (siehe 22. Tag).

Die gestern begonnene Schnittfärbung wird zu Ende geführt.

21. Tag.

Vakat.

22. Tag.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. f.

Die Bulbi kommen in 60 % Alkohol, die pyämischen Herde in fließendes Wasser.

IX. Übung: Diphtherie. e.

Der Belag auf der Agarstrichkultur ist dünn, grau; der Belag der Stichkultur ist ähnlich, klein; das Wachstum im Stichkanal bietet keine Besonderheiten. Auf den Agarplatten sieht der Rand der Kolonien noch zerrissener als gestern aus; man fertigt Klatschpräparate an. Die Bacillen erscheinen stark kolbig aufgetrieben, öfters sind Verzweigungen zu sehen. Im Gelatinestich ist das Wachstum perlschnurförmig, kümmerlich, ohne Verflüssigung. In der Bouillon dagegen ist es tüppig und erfolgt in Form von krümeligen Konglomeraten, die einen Bodensatz bilden und sich an den Wänden des Röhrchens hinaufziehen. Oft ist ein oberflächliches Häutchen entstanden; solche Kulturen sind meist virulenter, da durch den reichlich zutretenden Sauerstoff die Bildung von Gift begünstigt wird. Bei starker Vergrößerung findet man, daß die Bacillen mehr spitz, weniger kolbig aussehen als auf Löfflerschem Serum; auch liegen sie meist in kleinen Häufchen zusammen.

Die Bouillonkulturen des Diphtheriebacillus zeichnen sich vor denen der Pseudodiphtheriebacillen durch Säurebildung und durch Giftbildung aus. Erstere wird mit $\frac{1}{40}$ Normalnatronlauge titriert. — Da sich Natriumhydrat nicht genau abwiegen läßt, so löst man zunächst 1,575 g Oxalsäure in 1 l ausgekochten destillierten Wassers, wodurch man $\frac{1}{40}$ Normalsäure erhält; dann löst man etwas mehr als 1 g Natriumhydrat in 1 l destillierten Wassers, bringt beide Lösungen in Büretten und sieht, ob 50 ccm der Säure 50 ccm der Natronlauge genau entsprechen (Indikator: Phenolphthaleïn). Ist die Natronlösung zu stark, so setzt man Wasser, ist sie zu schwach, Natriumhydrat zu. — Stimmen dann die Lösungen genau überein, so titriert man die Bouillonkulturen, indem man zunächst 5 ccm noch nicht infizierter Bouillon in ein Erlemmeyerkölbchen bringt und angibt, wieviel ccm der $\frac{1}{40}$ Normalsäure zur Neutralisierung nötig sind, dann 5 ccm der Diphtheriebouillon in derselben Weise mit der $\frac{1}{40}$ Normalnatronlauge titriert. — Man findet, daß die Diphtheriebacillen viel Säure gebildet haben und zwar pflegt diese etwa 1—1,5 ccm $\frac{1}{40}$ Normalnatronlauge zu betragen.

Die Prüfung auf Virulenz geschieht in der Weise, daß man einem Meerschweinchen 0,2, einem anderen 1,0 unter die Bauchhaut injiziert, nicht genau in die Mittellinie, sondern etwas näher an einer Seite.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. a.

Stand eine Kultur eines choleraähnlichen Vibrio zur Verfügung, so werden daraus neue Kulturen angelegt (1); andernfalls sucht man sie aus Wasser zu isolieren (2).

1. Aus der Agarkultur werden folgende Kulturen angelegt: Gelatineplatten, Gelatinestich, und zwar von der stärker alkalischen Gelatine, (das Wachstum erfolgt mit größerer Sicherheit auf den stärker alkalischen Nährböden; doch ist es öfters auf dem gewöhnlich benutzten charak-

teristischer. Man legt daher die Kulturen am besten auf beiden an: Agarplatten, Agarstich, Bouillon, Peptonwasser (2 Kulturen), Kartoffel.

2. Man sucht die Vibrionen aus verschiedenen Wässern zu isolieren: Flußwasser, Wasser mehrerer Brunnen, Leitungswasser. — Je 1 l des zu untersuchenden Wassers wird mit 100 cem der (zehnpromzentigen) Peptonstammmlösung versetzt und gründlich durchgeschüttelt; dann in Kölbchen zu 100 cem verteilt und in den Brutschrank gestellt.

Ferner wird eine Schrägagarkultur von Friedländerschen Pneumoniobacillen angelegt.

23. Tag.

VIII. Übung: Staphylococcen und Streptococcen. g.

Die Ulcera werden mit einer feinen Schere aus den Bulbis ausgeschnitten, so daß nur kleine Stücke normalen Gewebes daran bleiben. Bei dem einen, das senkrecht zur Oberfläche geschnitten werden soll, macht man zwei parallele Schnitte hart am Rande des Geschwüres vorbei, an den anderen Seiten läßt man noch soviel normales Gewebe daran, wie die Breite des Geschwüres beträgt: das andere, das parallel zur Oberfläche geschnitten werden soll, umschneidet man an allen Seiten in einer Entfernung von 2 mm. — Die Stücke kommen in 96% Alkohol.

Die pyämischen Herde werden entsprechend weiter behandelt.

IX. Übung: Diphtherie. e.

Ist eines der infizierten Meerschweinchen eingegangen, so obduziert man es: Befund siehe 24. Tag. — Meist wird man eines oder beide krank finden: der Zustand ist apathisch, die Körpertemperatur, wie man schon mit der Hand fühlen kann, subnormal. An der Impfstelle ist meist ein weiches Ödem zu fühlen, das sich zu der entsprechenden Inguinaldrüse hinunterzieht, besonders wenn man die beiden Seiten miteinander vergleicht. Beim Nachfühlen muß das Tier von einem Gehilfen am Kopf und an den Hinterbeinen gehalten werden.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. b.

1. Wurde mit einer vorhandenen Reinkultur angefangen, so sind zunächst die Kulturen zu betrachten. Die Kulturen müssen vorsichtig aus dem Brutschrank herausgenommen werden, damit Häutchen, die sich auf den flüssigen Nährböden gebildet haben, nicht hinabsinken. — Die folgenden Beschreibungen gelten für Cholera-vibrionen, die frisch gezüchtet sind; alte Laboratoriumkulturen oder Kulturen von choleraähnlichen Vibrionen pflegen in einem oder einigen Punkten Abweichungen zu zeigen.

Auf den Gelatineplatten sind mit dem bloßen Auge sehr kleine Kolonien zu sehen; bei 60facher Vergrößerung sind sie hell und ungefärbt; verschiedene Teile einer Kolonie haben verschiedenes Lichtbrechungsvermögen, so daß sie wie mit Glassplittern bestreut erscheinen.

Auf den Agarplatten sind namentlich die Oberflächenkolonien charakteristisch; sie sind gegen das Licht gehalten durchsichtig mit einem bläulich irisierenden Schimmer.

Im Gelatinestich ist das Wachstum noch gering; nur wenn man ihn mit einer großen Menge Kultur gemacht hat, bemerkt man an der Oberfläche Verflüssigung. — Auf dem Agarstich hat sich ein dünner Belag entwickelt; das Wachstum im Stichkanal ist schwach. Auf der Kartoffel ist ein dünner gelblicher Belag zu sehen. — In Bouillon ist das Wachstum üppig; auf der Oberfläche hat sich ein Häutchen gebildet, die Flüssigkeit ist getrübt. Dasselbe ist bei dem Peptonwasser der Fall. Dieses wird auf Vorhandensein von Indol und Nitrit untersucht. — Da, wie früher erwähnt, salpetrige Säure und Indol die Rotreaktion ergeben und Cholera-vibrionen Indol bilden und Nitrat zu Nitrit reduzieren, so ist es nur nötig, durch Zusatz von 1 cem 25 % Schwefelsäure das Peptonwasser anzusäuern, worauf Rotfärbung eintritt. Sollte dies nicht der Fall sein, so setzt man etwas 0.5 % Natriumnitritlösung zu.

Aus dem anderen Peptonwasserröhrchen wird ein hängender Tropfen aus oberflächlichen Agarkolonien gefärbte Deckglaspräparate angefertigt. Man sieht kleine gekrümmte Stäbchen (Fig. 22), in ersterem Falle in lebhafter Eigenbewegung. Die Gramsche Färbung ist negativ.

Fig. 22. Cholera-vibrionen.
Bouillonkultur. 800:1.

Während man so die wichtigsten Eigenschaften der Cholera-vibrio kennen gelernt hat, liegt dem folgenden Teile der Gedanke zugrunde, daß die Cholera-vibrionen aus verdächtigem Stuhle oder Wasser zu züchten wären¹⁾. Ersteren stellt man sich in der Weise her, daß man eine Öse der Peptonwasserkultur mit etwa 1 g Stuhl — den man vorher in Wasser aufschwemmen kann — gut vermischt. Das Wasser wird verunreinigt, indem man 1 Öse Peptonwasserkultur und etwas Stuhl zu 1 l zusetzt und umschüttelt. Im mikroskopischen Präparate sieht man im Stuhl höchstens ganz vereinzelte Vibrionen neben vielen anderen Bazillen, im Wasser überhaupt keine Vibrionen. Der Stuhl wird in der Weise weiter untersucht, daß man in 6 Peptonwasserröhrchen je 1 Öse einbringt und mit einer Öse Gelatineplatten gießt. Zu dem Wasser (1 l) werden 100 cem der zehnprozentigen Peptonstammulösung zugesetzt, gut umgeschüttelt und in Kölbchen zu je 100 cem verteilt. Brutschrank. Die weitere Untersuchung wird am besten nach 8—12 Stunden vorgenommen. Die Agarplatten können beseitigt werden, ebenso die Bouillon- und Peptonwasserkulturen.

2. Suchte man von Anfang an Vibrionen aus dem Wasser zu isolieren, so fertigt man von der Oberfläche der gestern angelegten Kölbchen mit Peptonwasser hängende Tropfen und gefärbte Deckglaspräparate an. Das Kölbchen, das die meisten gekrümmten Stäbchen mit Eigenbewegung zeigt, wird weiter untersucht. Man impft von der Oberfläche in ein Röhrchen mit Peptonwasser und gießt Gelatineplatten; ferner gießt man in 3 Platten 3 % igen Agar, stellt diese, nachdem er erstarrt ist, offen mit dem Agar nach unten eine halbe Stunde in den Brutschrank, damit das Kondenswasser verdunstet und bestreicht dann mit einer Öse nacheinander die Oberflächen, ohne dazwischen abzuglühen.

1) Siehe: Anweisung zur Bekämpfung der Cholera. Amtliche Ausgabe. Berlin, Springer. 30 Pf

XI. Übung: Kapselbacillen. a.

Eine Maus wird mit einer Öse der Kultur von Friedländerschen Pneumoniebacillen subkutan infiziert.

Außerdem sind von jetzt an Platten, auf denen Schimmel gefunden wurde, für eine spätere Übung aufzubewahren.

24. Tag.

Zu beginnen ist mit der X. Übung.

VI. Übung: Staphylococcen. h.

Die Organe werden in entsprechender Weise weiterbehandelt.

VII. Übung: Diphtherie. f.

Wenigstens eines der infizierten Meerschweinchen ist eingegangen. Man obduziert es, indem man zunächst die Infektionsstelle freilegt und dann in der früher beschriebenen Weise vorgeht. Befund: An der Impfstelle starkes hämorrhagisches Ödem; starkes Pleura-, geringes Peritonealexsudat; Schwellung und Rötung der Nebennieren; geringe Hyperämie der übrigen Organe und der oberen Darmpartien.

Mikroskopisch sind an der Infektionsstelle nur wenige, in den inneren Organen und dem Pleuraexsudat keine oder höchst spärliche Bacillen nachzuweisen.

Geht das mit der geringeren Dosis infizierte Tier nicht sofort ein, so beobachtet man an der Infektionsstelle noch einige Tage teigige Schwellung; dann stößt sich die Partie ab. Die Tiere können infolge der Infektion noch nach Wochen und Monaten zugrunde gehen.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. c.

1. Auf den Gelatineplatten ist schon mit dem bloßen Auge Verflüssigung zu erkennen. Bei 60 facher Vergrößerung sieht man, daß die Kolonien zerfallen, indem in der Mitte der verflüssigten Stelle ein gelbbrauner Klumpen liegt, der sich in Bröckchen auflöst. Die Randpartie ist bedeutend heller; in ihr liegen höchstens vereinzelte kleine Massen. Auch in dem Gelatinestich ist Verflüssigung zu bemerken; dieselbe ist trichterförmig, doch liegt der größte Durchmesser nicht an, sondern etwas unterhalb der Oberfläche („scheidetrichterförmig“). Der verflüssigte Teil ist schon größtenteils verdunstet, so daß die Verflüssigungszone den Eindruck einer Luftblase macht. — Der Belag der Kartoffelkultur hat sich gebräunt.

Fortsetzung der Züchtung aus Stuhl und Wasser. Auf den Gelatineplatten sind neben vielen anderen nur vereinzelte Vibrionenkolonien zu sehen. Dagegen zeigen die Peptonwasserkulturen oberflächliche Häutchen, die, wie man bei Untersuchung im hängenden Tropfen findet, nur aus Vibrionen bestehen. Das Peptonwasser hat also diesen wesentlich bessere Lebensbedingungen geboten als den anderen Bakterien, es hat eine „Anreicherung“ der Vibrionen stattgefunden. — Doch sind

sie noch nicht in Reinkultur darin enthalten. Um eine solche zu erlangen, gießt man einerseits wieder Gelatineplatten, andererseits streicht man auf trockenen Agar oberflächlich aus. Man gießt zunächst sechs Röhrchen mit Agar (dreiprozentigen) in Petrischalen und stellt diese, nachdem er erstarrt ist, umgekehrt offen in den Brutschrank, damit das Kondenswasser verdunstet. Dann bringt man eine Öse von der Oberfläche eines Peptonwasserröhrchens auf eine der Platten und verstreicht sie zuerst auf dieser, dann (ohne abzuglühen) auf einer zweiten und einer dritten. — Mit den anderen 3 Platten verfährt man ebenso. — Außerdem infiziert man aus den Peptonwasserröhrchen einige neue.

Ein analoger Befund wie bei Kulturen aus dem Stuhl ergibt sich bei dem mit Peptonlösung versetzten Wasser. Auch hier untersucht man im hängenden Tropfen und legt Gelatine-, Agar- und Peptonwasserkulturen an.

2. Ging man von Anfang an vom Wasser aus, so untersucht man die Gelatine- und die Agarplatten auf Kolonien, die den oben beschriebenen (X. Übung b. 1) Cholerakolonien ähnlich sehen. Diese werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Zeigen sie eine, wenn auch nur geringe Krümmung, so werden die oben angegebenen Kulturen angelegt.

XII. Übung: Desinfektion. a.

Seidenfäden werden in 1 cm lange Stücke geschnitten in Petrischalen gelegt und bei 150° $\frac{1}{2}$ Stunde lang desinfiziert. Statt der Seidenfäden können auch Granaten von etwa 1 mm Durchmesser verwendet werden, die vor dem Sterilisieren durch Kochen in Wasser und Behandeln mit Salzsäure gereinigt werden müssen. Im ganzen sind etwa 120 Seidenfäden resp. Granaten nötig.

Ferner werden in 3 Petrischalen Uhrschälchen und in 3 anderen etwas Filtrierpapier sterilisiert.

Ferner legt man je 2 Schrägagarkulturen von Milzbrandbacillen, Staphylococcen und Vibrionen an.

25. Tag.

VIII. Übung: Staphylococcen. i.

Die Organe werden in entsprechender Weise weiter behandelt.

X. Übung: Choleraähnliche Vibrionen. d.

Auf den Gelatineplatten ist die Verflüssigung und — bei 60facher Vergrößerung betrachtet — die Auflösung der Kolonien fortgeschritten. Der Gelatinestich zeigt das Aussehen wie gestern, nur noch charakteristischer. Man legt noch zwei Agarkulturen an, um sie am nächsten Tage einschmelzen und aufbewahren zu können; die anderen Kulturen können beseitigt werden.

Fortsetzung der Züchtung aus Stuhl und Wasser. Auf den Agarplatten bemerkt man neben wenigen anderen viele Vibrionenkolonien, die durch ihren bläulich irisierenden Schimmer erkennbar sind. Man impft einige ab und untersucht sie im hängenden Tropfen. Sind

es lebhaft bewegliche Vibrionen, so ist die Züchtung durch Anreicherung gelungen. Bei der Stellung einer Choleradiagnose untersucht man noch, ob die Vibrionen durch Choleraserum in hoher Verdünnung agglutiniert werden; ferner impft man auf schrägen Agar ab und sieht, ob die Pfeiffersche Reaktion am nächsten Tage positiv ausfällt; darauf soll in diesen Übungen erst später eingegangen werden. Auch auf den Gelatineplatten sieht man bedeutend mehr Vibrionenkolonien als auf den direkt aus dem Stuhl angelegten. Die Kulturen können beseitigt werden.

2. Ging man von Anfang an vom Wasser aus, so beobachtet man, ob die Kulturen die unter 1. erwähnten Eigenschaften zeigen.

XI. Übung: Kapselbacillen. b.

Ist die Maus eingegangen, so wird sie in der gewohnten Weise obduziert; die Organe werden teils in Formalin eingelegt, teils mikroskopisch und kulturell untersucht. Man sieht in den mit Fuchsin gefärbten Präparaten kurze, plumpe, oft sogar ovale Stäbchen, vielfach zu zweien, mit einer Kapsel. Ferner färbt man nach Gram; diese Färbung ist nur dann positiv, wenn man schwach entfärbt. Man wendet daher die Weigertsche Modifikation an, d. h. man spült nach der Jodbehandlung mit Wasser ab, trocknet mit Filtrierpapier, läßt vollends lufttrocken werden und legt das Präparat so lange in ein Schälchen mit Anilinyxylol (2 Teile Anilin, 1 Teil Xylol), bis es eben farblos erscheint. Dann legt man es einige Minuten in 2mal gewechseltes Xylol (da das Anilin sonst noch nachträglich entfärben würde) und bettet in Zedernöl ein. Die Bacillen erscheinen dunkelviolett, das Gewebe farblos. Sind viele Stäbchen vorhanden, so untersucht man auch im hängenden Tropfen: man sieht dann, daß die Stäbchen unbeweglich sind. Aus den Organen werden Agar- und Gelatineplatten gegossen.

XII. Übung: Desinfektion. b.

Um die Bakterien in einer handlichen Form zur Prüfung ihrer Widerstandsfähigkeit untersuchen zu können, trocknet man sie an die Seidenfäden oder Granaten an. Man bringt in jedes der sterilisierten Uhrschälchen 2–3 cem sterile physiologische Kochsalzlösung und schwemmt in jedem eine der Bakterienarten auf, indem man eine Öse nach der anderen etwas über dem Rande der Flüssigkeit fein verreibt, bis diese stark getrübt ist. Besonders die Milzbrandkulturen müssen gut verteilt und dann auf Sporenbildung untersucht werden. Dann legt man die Seidenfäden (oder die Granaten) hinein und zwar zu den Vibrionen 10, zu den Staphylococcen und Milzbrandbacillen je 30. Wenn sie sich vollgesogen haben, nimmt man sie heraus, läßt an dem sterilen Filtrierpapier die überschüssige Flüssigkeit ablaufen und legt zunächst von jeder Art einen Seidenfaden auf eine Agarplatte (Kontrolle).

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Neun Fäden von jeder Art werden in Petrischalen gelegt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. Die Bakterien müssen zunächst an die Seidenfäden angetrocknet werden.

---

1) War die Kultur avirulent, so daß sich der Tod des Tieres lange verzögert hat, so sieht man manchmal merkwürdige Involutionsformen wie Kugeln, feine Stäbchen etc.

Man nimmt die übrigen Seidenfäden heraus, trocknet sie oberflächlich an dem Filtrierpapier, legt sie in Petrischalen, doch so, daß sie einander nicht berühren und stellt diese, nachdem man sie etikettiert hat, offen in einen Exsikkator, den man über Nacht an einem kühlen Ort aufbewahrt, damit die Sporen nicht auskeimen.

Außerdem werden in einem sterilen Erlenmeyerkölbchen 50 bis 100 ccm Wasser im Dampftopf sterilisiert und drei Schrägagarkulturen von Typhus angelegt.

26. Tag.

VIII. Übung: Staphylococcen. k.

Die Organe werden in Paraffin oder Celloidin eingebettet.

XI. Übung: Kapselbacillen. c.

Auf den Agarplatten sind große, runde, weiße Kolonien gewachsen, von denen sich bei der Berührung mit der Nadel kurze Fäden ausziehen lassen. Bei 60facher Vergrößerung erscheinen sie gelbbraun mit glattem Rande.

Auch auf Gelatine ist das Wachstum üppig; die Kolonien ragen über die Oberfläche der Gelatine empor. Keine Verflüssigung. — Im hängenden Tropfen sieht man plumpe, unbewegliche Stäbchen. Im gefärbten Deckglaspräparate ist außerdem noch auf ihre Lagerung zu achten: sie berühren sich fast niemals, sondern liegen in geringer Entfernung voneinander, da sie auch auf künstlichem Nährboden eine Kapsel bilden. — Aus oberflächlichen Kolonien werden folgende Kulturen angelegt: Agarstich, Agarstrich, Gelatinestich, Bouillon, Schüttelkultur in Traubenzuckeragar, Kartoffel, Milch.

XII. Übung: Desinfektion. c.

Man lese zunächst diesen ganzen Abschnitt durch, da gleichzeitig mehrere Untersuchungen gemacht werden können. — Die Seidenfäden müssen über Nacht trocken geworden sein. — Auf den zur Kontrolle auf Agarplatten gelegten ist reichliches Wachstum erfolgt.

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Nachdem die dazu bestimmten Seidenfäden nummehr einen Tag getrocknet sind, wird von jeder Art einer herausgenommen und alle drei in möglichst großem Abstand voneinander auf eine Petrischale mit Agar gelegt.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. Mit dieser Übung verbindet man zweckmäßig Übung XIII a. Zunächst soll die Widerstandsfähigkeit gegen eine Temperatur von 60° untersucht werden. — Man gießt 4 Agarröhrchen in Petrischalen aus, bringt von dem gestern sterilisierten Wasser je etwa 10 ccm in 3 sterile Reagenzgläser, stellt in eines davon ein Thermometer und setzt alle vier in ein Wasserbad, das man erhitzt, bis das Thermometer 60° anzeigt. Auf dieser Temperatur sucht man es zu erhalten. Dann legt man in jedes Reagenzglas 6 Seidenfäden einer Bacterienart und nimmt mit einer langen Pinzette (für jedes Reagenzglas ist eine besondere zu benutzen) nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 Minuten und 2 Stunden einen Seidenfaden heraus und legt ihn auf Agar. Die Pinzetten müssen jedesmal abgeglüht

werden. Auf der Rückseite der Petrischale vermerkt man mit Tinte die Dauer der Einwirkung.

Die Widerstandsfähigkeit gegen Kochen wird in folgender Weise geprüft: Man macht ein dünnwandiges Becherglas von etwa 200 cem halb voll Wasser, erhitzt zum Köchen, bringt 6 Seidenfäden hinein und nimmt nach 1, 2, 5, 7, 10, 15 Minuten je einen heraus und legt sie auf Agarplatten. Zuerst werden die Staphylococcen, dann die Milzbrandbacillen untersucht.

Größere Gegenstände, wie Kleidungsstücke, können nicht ausgekocht, sondern müssen im Dampf sterilisiert werden. Man schlägt zur Übung infizierte Seidenfäden in Filtrierpapier ein, macht aus alten Kleidungsstücken, Teppichen etc. ein Paket, in das man die Testobjekte und, wenn vorhanden, ein Maximumthermometer hineinsteckt und bringt das Ganze in den Dampfkochtopf. Einige Seidenfäden und ein mit Tinte beschriebenes Papier werden in ein Buch gelegt (das bei der Desinfektion zugrunde gehen darf) und dieses mit Bindfaden umschmürt. Außerdem wird ein alter Schuh oder ein Stück Leder dazugelegt. Aus dem Dampftopf ragt ein Thermometer hervor, das aber nur angibt, wann in dem die Kleider umgebenden Raume die Temperatur von 100° erreicht ist. Will man dies auch für das Innere derselben wissen, so muß man ein Kontaktklingelthermometer zu Hilfe nehmen. Dieses besteht aus einer elektrischen Klingel, die durch Drähte mit einer Hülse in Verbindung steht. In dieser befindet sich eine Metallegierung, die bei 100° schmilzt, wodurch der Strom geschlossen und die Klingel in Bewegung gesetzt wird. — Die Hülse wird in die tiefsten Schichten der Kleider eingewickelt. — Hierauf wird der Dampfapparat in Tätigkeit gesetzt. Hat die Temperatur von 100° im Innern 20 Minuten eingewirkt, so dreht man die Flamme ab und nimmt die Gegenstände heraus. Das Buch ist aus dem Leim gegangen, dagegen die Tinte nicht verwischt; das Leder ist hart und unbrauchbar geworden; die Kleidungsstücke haben nicht gelitten. Die Seidenfäden werden auf Agarplatten gelegt. — Wesentlich schlechter als feuchte wirkt trockene Hitze. Man untersucht in der Weise, daß man Seidenfäden in Kleidungsstücke oder Watte dicht einschlägt, diese im Trockensterilisierungsschrank auf 100° erhitzt, nach 5, 10, 20, 30, 60 Minuten je einen herausnimmt und auf Agarplatten legt.

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. a.

Man übergießt die Typhusagarröhrchen mit etwas physiologischer Kochsalzlösung, reibt den Belag hinein, schüttet alles in ein steriles Reagenzglas und erwärmt $\frac{1}{2}$ Stunde auf 60° im Wasserbad. Eine Öse streicht man auf Agar aus, um zu sehen, ob Abtötung erfolgt ist. Das übrige injiziert man einem Kaninchen subkutan. Das Tier muß vorher gewogen werden; in den nächsten Tagen verliert es etwas an Gewicht.

Ferner sind je zwei Kulturen von Staphylococcen und Milzbrandbacillen auf schrägem Agar anzulegen und von jeder Art Oberflächenausstriche auf ausgegossene Agarplatten zu machen.

27. Tag.

XI. Übung: Kapselbacillen. d.

Auf allen Nährböden ist üppiges Wachstum erfolgt. Der Belag des Agarstiches und -striches ist kräftig, schleimig, der des Gelatine-

stiches halbkugelförmig (Nagelkopfform). Die Bouillon ist gleichmäßig getrübt mit starkem Bodensatz, der Zucker vergohren, die Milch nicht geronnen; die Kartoffel zeigt einen bräunlichen Belag. — Die Agarkulturen werden eingeschmolzen und aufbewahrt, die übrigen Kulturen können beseitigt werden außer der Gelatinekultur, die noch einige Tage beobachtet wird.

XII. Übung: Desinfektion. d.

(Zu beginnen ist mit der Formalindesinfektion.)

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Die gestern auf Agar gelegten Seidenfäden werden betrachtet und notiert, ob üppiges, spärliches oder überhaupt kein Wachstum erfolgt ist. Man verwechsle nicht zufällige Verunreinigungen mit den zu untersuchenden Bacillen. Ist kein Wachstum erfolgt, so stellt man die Platten in den Brutschrank zurück, da es noch nach einigen Tagen eintreten kann. — Dann nimmt man von jeder Art einen weiteren Faden heraus und legt sie auf eine Agarplatte.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. An den auf 60° erhitzten Seidenfäden sind die Bakterien bei kurzer Einwirkung noch nicht geschädigt. Bei längerer Einwirkung ist bei den Staphylococcen eine Verminderung an Zahl und eine Hemmung des Wachstums, später völlige Abtötung zu konstatieren. Die Milzbrandsporen dagegen bleiben völlig ungeschädigt. — Durch das Kochen werden die Staphylococcen sehr schnell, die Milzbrandsporen etwas langsamer abgetötet. Ebenso wurde durch die Desinfektion im strömenden Dampf völlige Abtötung erzielt. Viel langsamer, wenn überhaupt, hat die trockene Erhitzung eingewirkt. — Sämtliche Platten kommen in den Brutschrank zurück, da sich bei längerem Aufbewahren vielfach noch Keime entwickeln.

3. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen chemische Desinfektionsmittel. a) Benutzt wird 5% Kresolseifenlösung. Die abtötende Wirkung wird in folgender Weise geprüft: Zunächst werden die Nährböden (12 Agar- und 12 Gelatineröhrchen) verflüssigt und in Wasser von 40° gehalten, außerdem 12 Bouillonröhrchen bereitgestellt. Dann macht man die Lösung des Desinfektionsmittels doppelt so stark als man sie anwenden will (d. h. man mischt einen Teil der käuflichen Kresolseifenlösung mit 9 Teilen Wasser; diese Mischung ist gleich der Aqua cresolica des Arzneibuchs), verreibt einige Ösen der Staphylococcenkultur in einem Reagenzglas mit 2 ccm sterilen Wassers, so daß eine sichtbare Trübung entsteht, und mischt beides zu gleichen Teilen gut durch. Hiervon gießt man sofort mit einer Öse eine Agarplatte, mit einer anderen eine Gelatineplatte, eine dritte bringt man in Bouillon. Dasselbe wiederholt man nach 2, 5, 10, 15, 30 Minuten. In gleicher Weise wird die Milzbrandkultur untersucht.

b) Zur Prüfung der entwicklungshemmenden Wirkung macht man sich eine 1% Sublimatlösung, die man mit sterilem Wasser 10fach, 100fach und 1000fach verdünnt. Von jeder der 4 Lösungen bringt man 1 ccm zu 9 ccm Bouillon. Man hat so Lösungen 1:1000, 1:10000, 1:100 000 und 1:1000 000. Jede Lösung macht man viermal, infiziert sie mit einer großen Öse voll Staphylococcen resp. Milzbrandbacillen und stellt von jeder Art eine in den Brutschrank, eine in Zimmertemperatur.

c) Gasförmige chemische Desinfektionsmittel. Die gestern angelegten Platten werden umgekehrt und auf den jetzigen Boden ein

mit Chloroform getränktes Wattebäuschehen gebracht. Nach 1 Stunde impft man von der Kultur in Bouillon ab.

Formalin: Steht ein Zimmer zu den Versuchen zur Verfügung, so geht man in folgender Weise vor: Die darin befindlichen Gegenstände stellt man so, daß sie dem Gase leicht zugänglich werden (Kleider ausgebreitet aufhängen; Schubladen öffnen etc.). Alle Öffnungen, durch die das Gas ausströmen kann (Ventilationsöffnungen, Fensterritzen, Schlüsselöcher, Ofentüren etc.), werden mit sublimatgetränkter Watte gedichtet. Das Zimmer wird ausgemessen und in den Apparat soviel Formalin gebracht, daß auf den Kubikmeter 5 g Formaldehyd kommen; ferner die 5fache Menge Wasser. Dann werden an einige entlegene Stellen des Zimmers einige Staphylococcenseidenfäden gelegt, ferner auch (zur Übung) einige in eine verschlossene Schublade. Darauf wird der Apparat in Gang gesetzt. 7 Stunden später wird zur Bindung des Formalins Ammoniak eingeleitet. Näheres über die Bedienung der einzelnen Apparate ist auf der ihnen beigelegten Gebrauchsanweisung zu sehen. Die Seidenfäden werden in stark verdünnter Ammoniaklösung und dann in sterilem Wasser abgewaschen und auf Agarplatten resp. in Bouillon gebracht.

Für den übernächsten Tag ist je eine Kultur von Typhusbacillen auf schrägem Agar anzulegen.

Ferner ist die Blechbüchse mit den Pipetten bei 150° eine halbe Stunde lang zu sterilisieren; in das obere Ende der Pipetten ist vorher etwas Watte hineinzustecken, damit ein Übertreten der Kultur in den Mund verhindert wird. — Gleichzeitig werden 12 kleine Hölzchen von 2 cm Länge und $\frac{1}{2}$ —1 cm Breite messerklingenähnlich zugeschnitten und in einer Petrischale mitsterilisiert.

Schließlich ist für Schwefelammonium zu sorgen (Darstellung durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in Ammoniak; auch in den Apotheken erhältlich).

28. Tag.

Vakat.

29. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. e.

1. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen. Wie am 27. Tag.

2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Hitze. Es ist zu untersuchen, ob an einzelnen Seidenfäden verspätetes Wachstum eingetreten ist.

3. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen chemische Desinfektionsmittel.

a) Die abtötende Wirkung der Kresolseifenlösung ist zunächst an den Agarplatten zu untersuchen. Auf der sofort gegossenen Agarplatte ist sehr dichtes Wachstum zu bemerken. Schon nach 1 Minute ist es bedeutend spärlicher und hört schnell ganz auf. Die auf jeder Platte gewachsenen Kolonien werden gezählt und in eine Tabelle eingetragen, wann noch Keime gewachsen sind, wieviel, auf welchem Nährboden und

am wievielten Tage. Die Zählung geschieht, wenn die Kolonien weit auseinander stehen, in der Weise, daß man bei jeder gezählten Kolonie auf die Rückseite der Platte einen Punkt mit Tinte macht. Sind die Kolonien so nahe beisammen, daß das nicht möglich ist, so nimmt man das Zählbrett zu Hilfe. Dieses ist in Quadrate von 1 cm Seite eingeteilt. Man stellt die Platte offen darauf, bedeckt sie mit einer Glasplatte, zählt, wenn nötig mit Zuhilfenahme einer Lupe, einige Quadrate durch und berechnet daraus die Gesamtzahl. Ist auch dies nicht möglich, so bezeichnet man die Zahl als unendlich groß (∞). — In gleicher Weise betrachtet und zählt man die Gelatineplatten durch. Dabei wird man oft finden, daß auf den Agarplatten noch zu einer Zeit Wachstum erfolgt, wo es auf den Gelatineplatten schon fehlt: ferner, daß die Keimzahl auf den Agarplatten größer ist. Wendet man also die Gelatineplattenmethode an, so erhält man anscheinend schon Abtötung, wenn noch lebende Keime vorhanden sind. Die Agarplattenmethode ist also genauer und allein verwendbar. — Umgekehrt findet man manchmal in der Bouillon noch Wachstum, wenn die Agarplatten schon steril sind. Die damit erhaltenen Resultate sind also noch genauer: doch leiden sie unter dem Fehler, daß eine quantitative Bestimmung unmöglich ist. Außerdem ist bei der Bouillon in derartigen Fällen stets näher zu untersuchen, ob Verunreinigung durch Luftkeime vorliegt, während dies bei den Agarplatten meist schon bei der bloßen Betrachtung entschieden werden kann. In Wirklichkeit wird man stets auf Agar und in Bouillon prüfen. — Die Kulturen kommen in die Schränke zurück.

b) Das Sublimat hat je nach der Konzentration mehr oder weniger entwicklungshemmend gewirkt. In den ersten Bouillonröhrchen ist kein Wachstum erfolgt (Eiweißniederschläge nicht damit verwechseln!), später ist sie schwach: bei der stärksten Verdünnung erfolgt das Wachstum ungehemmt. Die Wirkung pflegt bei 23° stärker hervorzutreten als bei 37°. Doch könnte das Ausbleiben des Wachstums auch auf Abtötung der Bakterien beruhen. Man nimmt daher vom Bodensatz der steril gebliebenen Röhrchen etwas weg und impft es in Bouillon über. Erfolgt nun Wachstum, so waren die Bakterien zwar am Leben, wurden aber durch das Sublimat an der Vermehrung gehindert.

c) Das Chloroform hat schnelle Abtötung bewirkt. Ebenso sind die von der Formalindesinfektion stammenden Seidenfäden steril, wenigstens soweit sie frei gelegen waren. Dagegen ist an denen, die in der Schublade gelegen waren, Wachstum erfolgt. Das Formalin ist also ein gutes Oberflächendesinfiziens, vermag aber nicht in die Tiefe zu dringen.

Fortsetzung der chemischen Desinfektion. d) Untersucht man an Seidenfäden angetrocknete Bakterien auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen ein chemisches Desinfektionsmittel, so muß man dafür sorgen, daß dieses nicht noch auf den Nährböden entwicklungshemmende Eigenschaften entfalten kann. Auswaschen in Wasser ist vielfach ungenügend, am besten wird das Desinfektionsmittel chemisch gebunden (z. B. oben Formaldehyd durch Ammoniak). Man legt 12 Milzbrandseidenfäden in 1‰ Sublimatlösung, nimmt nach 2, 5, 10, 15, 30, 60 Minuten je zwei heraus, spült den einen nur in sterilem Wasser, den anderen in sterilem Wasser, verdünnter Schwefelammoniumlösung und wieder sterilem Wasser ab. Durch das Schwefelammonium wird das Sublimat ausgefällt (schwarzer Niederschlag). Die Seidenfäden kommen dann auf Agarplatten.

Zur Desinfektion grober Massen, Stuhl etc., wird Kalkmilch verwendet. Diese soll in unseren Versuchen in einem dünnwandigen Becherglas in

der Weise bereitet werden, daß man einen Teil gebrannten Kalk mit vier Teilen Wasser mischt, und zwar werden zunächst 30 ccm Wasser in das Glas gebracht, dann 40 ccm (= 120 g) Kalk hineingeschüttet und, wenn der Kalk das Wasser aufgesogen hat und zerfallen ist, noch 130 ccm Wasser zugegeben und beides verrührt. In ein anderes Becherglas bringt man eine Portion Stuhl; dazu fügt man die Kalkmilch mindestens in gleicher Menge und mischt gut durch. Nach zwei Stunden gießt man aus dem Gemisch mit einigen Ösen eine Agarplatte, einige Ösen bringt man in Bouillon.

Außerdem ist ein Erlenmeyerkölbchen mit 99 und ein Reagenzglas mit 9 ccm Wasser im Dampftopf zu sterilisieren.

4. Baktericide Wirkung des Sonnenlichtes. Mit einer kleinen Öse Typhuskultur wird eine Agarplatte gegossen und zum Zwecke des oberflächlichen Austrocknens $\frac{1}{4}$ Stunde lang offen in den Brutschrank gestellt. Dann nimmt man sie heraus, setzt den Deckel auf, schneidet ein breites Kreuz aus schwarzem Papier und klebt dieses auf die Unterseite. Hierauf wird die Platte im Sommer eine, im Winter zwei Stunden lang umgekehrt in die Sonne gestellt, so daß der betreffende Teil von dem Kreuze bedeckt ist; die Sonnenstrahlen müssen senkrecht auffallen. Dann wird sie in den Brutschrank gestellt.

Ferner sind 300 ccm Rinderblut zu besorgen und zur Abscheidung von Serum kühl zu stellen, oder noch besser nach der Gerinnung sofort zu zentrifugieren und in der S. 56 angegebenen Weise weiter zu behandeln.

30. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. f.

1. und 2. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen und gegen Hitze. Wie am 29. Tag.

3. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen chemische Desinfektionsmittel.

a) Abtötende Wirkung der Kresolseifenlösung. b) Entwicklungshemmende Wirkung des Sublimats. c) Abtötende Wirkung des Chloroforms und des Formalins. — Die Kulturen werden betrachtet und an der Hand der gestern gemachten Notizen untersucht, ob sich das Wachstum vermehrt hat.

d) An den Seidenfäden, die in Sublimat gelegen waren und nur in Wasser ausgewaschen wurden, ist schon nach kurzer Zeit kein Wachstum mehr eingetreten, so daß Abtötung erfolgt zu sein scheint. An denjenigen dagegen, die nachher mit Schwefelammonium ausgewaschen wurden, hat überall Wachstum stattgefunden. Im ersteren Falle wurde also Abtötung nur dadurch vorgetäuscht, daß anhaftende Spuren von Sublimat noch auf dem Agar entwicklungshemmende Wirkungen entfalteten.

4. Baktericide Wirkung des Sonnenlichtes. Nach Ablösen des Kreuzes findet man, daß überall in seinem Bereich Wachstum kleiner Kolonien stattgefunden hat, während der besonnte Teil der Platte steril geblieben ist. Höchstens am Rande greift, besonders wenn Kondenswasser auf der Platte war, das Wachstum auf die belichtete Seite über.

5. Händedesinfektion. Man feuchtet eine Hand mit sterilem Wasser leicht an und schabt eine Hälfte mit einigen der sterilisierten Hölzchen, die man mit einer ausgeglühten Pinzette faßt, kräftig ab, u. a.

anch den Unternagelraum. Diese werden einige Male über Agarplatten weggestrichen und dann daraufgelegt. Dann desinfiziert man sich die Hände nach einer der üblichen Methoden, spült das Desinfektionsmittel mit sterilem Wasser weg und schabt sie wieder mit den Hölzchen ab. Um entwicklungshemmende Nachwirkung des Sublimats auf den Nährböden zu verhindern, müssen sie zunächst in schwache Schwefelammoniumlösung und dann in steriles Wasser getaucht werden, dann bestreicht man die Nährböden wie vorher. — Die Platten kommen in den Brutschrank.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. a.

Untersucht wird reines Leitungswasser und verunreinigtes Brunnen-, Fluß- oder Bachwasser. Das Leitungswasser wird in der Weise entnommen, daß man zuerst das vorderste Wasser — einige ccm — abläßt, dann mit einem Spiritus- oder Bunsenbrenner den Hahn erhitzt, bis das Wasser durch den Dampf herausgedrückt wird. Dann läßt man 20 Minuten laufen. Nach dieser Zeit senkt man den Rand eines sterilen Reagenzglases ab und füllt es zur Hälfte. Die weitere Untersuchung soll nicht später als $\frac{1}{2}$ Stunde nach Entnahme erfolgen. Man entnimmt mit einer sterilen Pipette 1.0, 0.5, 0.1 ccm und bringt es in Petrischalen. Dazu schüttet man ein verflüssigtes Gelatineröhrchen, mischt durch Drehen gut durch und läßt erstarren. (Noch besser ist Agargelatine, die aus gleichen Teilen dieser Nährböden besteht.)

Die Entnahme aus einem Kesselbrunnen oder Fluß geschieht in der Weise, daß man ein steriles Reagenzglas mit der Hand schnell untertaucht, resp. an einem Bindfaden hinabläßt. — Zur Entnahme aus der Tiefe sind kompliziertere Methoden nötig. — Man gießt zunächst mit 1.0 und 0.1 ccm in der angegebenen Weise Platten; da aber derartiges Wasser sehr viele Keime zu enthalten pflegt, muß es auch verdünnt untersucht werden. Man bringt also in das vorher (29. Tag) sterilisierte Wasser je 1 ccm, wodurch man 10fache resp. 100fache Verdünnung erhält und gießt, indem man andere Pipetten verwendet, wieder mit 1.0 und 0.1 ccm Platten. Die Platten werden bei 23° aufbewahrt.

XV. Übung: Pneumococcen. a.

Steht pneumonisches Sputum oder pneumonische Lunge von einer Sektion zur Verfügung, so untersucht man es im gefärbten Deckglaspräparat (10fach verdünntes Karbolfuchsin; Gram) und im hängenden Tropfen. Man sieht Coccen, meist zu zweien, seltener zu vierten, von einer Kapsel umgeben. Sie sind meist an dem voneinander abgewendeten Ende zugespitzt und gleichen 2 Flammen, die sich mit der Basis berühren; doch sind auch runde Pneumococcen häufig. Intracelluläre Lagerung kommt erst nach der Krisis häufig vor. Die Färbung nach Gram ist positiv. Man legt nur Oberflächenkulturen an, und zwar auf Löfflersehem Serum (3 Röhrchen mit derselben Öse ohne dazwischen auszuglühen), schrägem Glycerinagar und Glycerinagarplatten; ferner infiziert man mit einer Öse eine Maus subkutan.

Ist kein pneumonisches Sputum zu erhalten, so sucht man die Pneumococcen aus dem Speichel Gesunder zu züchten. Der Nachweis auf Nährböden ist in diesem Falle sehr schwierig, da die sehr kleinen Pneumococcenkolonien schnell von anderen Bakterien überwuchert werden. Dagegen steht uns im Körper der Maus ein Mittel zur Rein-

gewinnung zur Verfügung, da diese für Pneumococcen sehr, für andere Mundbakterien weniger empfänglich ist. Man injiziert also 4—5 Mäusen je 0,3 cem Speichel verschiedener Menschen subkutan.

Ferner wird etwas rohes Fleisch mit der Hand in ein nicht steriles Reagenzglas gebracht und etwas Wasser dazugegeben, doch so, daß das Fleisch nicht ganz davon bedeckt ist. Aufbewahrung offen bei 23°.

Für den nächsten Tag ist aus einer Brauerei oder Bäckerei Hefe zu besorgen.

Das Rinderserum ist in Reagenzgläser zu verteilen und zur Sterilisierung 2 Stunden lang zwischen 56 und 58° zu halten; die Temperatur von 60° darf nicht erreicht werden. Diese Erhitzung ist auch an den folgenden Tagen vorzunehmen; man bezweckt damit, die Sporen zum Auskeimen zu bringen und dann die vegetativen Formen abzutöten (fraktionierte Sterilisierung).

31. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. g.

1. 2. 3. 4. Wie an den vorhergehenden Tagen.

5. Händedesinfektion. Auf den Platten von der Desinfektion sind mehr oder minder zahlreiche (Hände, die täglich desinfiziert werden, sind oft steril) Keime gewachsen; nach der Desinfektion sind sie steril geblieben. Sind doch Kolonien vorhanden, so sieht man, ob sie sich in den mit den Hölzchen gezogenen Strichlinien befinden, da es sich auch um daraufgefallene Luftkeime handeln könnte. Kolonien von besonderer Art werden mikroskopisch und kulturell weiter untersucht.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. b.

Die Platten werden nur untersucht und gezählt, wenn sich so viele Kolonien darauf befinden, daß man fürchtet, sie könnten bis zum nächsten Tag verflüssigt werden.

XV. Übung: Pneumococcen. b.

Wurde von pneumonischem Sputum ausgegangen, so werden die Kulturen weiter untersucht. Auf dem Löfflerschen Serum sind die Pneumococcenkolonien zahlreich vorhanden, aber sehr klein; daneben sind noch andere Kolonien aufgegangen. Auf dem Glycerinagar erfolgt manchmal überhaupt kein Wachstum; ist es vorhanden, so sind die Kolonien noch kleiner als auf dem Serum. Die Schrägagarkulturen werden mit der Lupe betrachtet, indem man sie gegen das Fenster hält; sie erscheinen schwach getrübt. — Auf den Platten sieht man bei 60facher Vergrößerung sehr zarte durchscheinende Kolonien mit fein granuliertem Rand. — Im hängenden Tropfen sieht man unbewegliche Coccen, meist zu zweien, manchmal in kurzen Ketten. Aus dem Löfflerschen Serum fertigt man Ausstrichpräparate, von den Platten Klatschpräparate an; man findet im ersteren Falle neben gut erhaltenen zahlreiche verquollene, im letzteren fast nur normal aussehende Pneumococcen. Hat man dann sicher die Pneumococcenkolonien kennen gelernt, so legt man Gelatinestich, Agarstich, Agarplatten und Bonillonkultur an.

Ist eine der gestern infizierten Mäuse eingegangen, so wird sie in der am 32. Tage besprochenen Weise untersucht.

XVI. Übung: Schimmel und Hefen.

Die seit einiger Zeit aufbewahrten Schimmel werden zunächst bei 60 facher, dann bei starker Vergrößerung ungefärbt untersucht. Wasser haftet an ihnen schlecht: sie werden daher, nachdem man sie mit einem Messer abgekratzt hat, in 60% Alkohol mit einigen Tropfen Ammoniak auf einem Objektträger zerzupft und mit einem Deckglas bedeckt. Am häufigsten findet man *Mucor*, *Aspergillus* und *Penicillium*. Bei *Mucor* befinden sich die Sporen am Ende des Fruchtkärgers in einer kugelförmigen Hülle: bei den beiden anderen stehen sie an seinem Ende frei und werden kettenförmig abgeschnürt, und zwar ist bei *Aspergillus* der Fruchtkärgers halbkugel- oder keulenförmig und einfach, bei *Penicillium* mehrfach verzweigt. Von dem Mycel und den Sporen fertigt man auch gefärbte Deckglaspräparate an und betrachtet sie genau, um sie nicht später mit anderen Gebilden zu verwechseln. Die Kulturen können dann beseitigt werden.

Die Hefe wird im hängenden Wassertropfen und im gefärbten Deckglaspräparat (Fuchsin und Gram) untersucht. Man sieht unbewegliche, elliptische Gebilde, die sich schon durch ihre GröÙe leicht von Bakterien unterscheiden. An vielen kann man die Vermehrung durch Sprossung — Herauswachsen einer kleinen Form aus einer groÙen — bemerken. Die Färbung nach Gram ist positiv.

XVII. Übung: Bakterien aus der *Proteus*gruppe. a.

Das Wasser, in das gestern das rohe Fleisch gelegt wurde, wird im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Man sieht Bakterien von allen Formen darin. Dann werden 4 Gelatine- und 4 Agarplatten daraus gegossen.

Das Rinderserum wird wie gestern sterilisiert.

32. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. h.

Wie am 31. Tag. — Man vollendet die Zusammenstellung der Resultate (Tabelle), dann können die Platten, die 7 Tage im Brutschrank gestanden waren, beseitigt werden.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. c.

Die Platten werden wie bei der Desinfektion angegeben, gezählt und die ermittelten Zahlen in eine Tabelle eingetragen. Einige auffallende Kolonien, z. B. verflüssigende grüne, werden abgeimpft und mikroskopisch und kulturell weiteruntersucht (Agar, Gelatine, Kartoffel). — Man achte darauf, daß in der abzuimpfenden Kolonie nicht eine andere liegt. Damit die verflüssigenden Kolonien sich nicht weiter ausbreiten, werden sie abgetötet, indem man in jede mit der Pinzette einige Kaliumpermanganatkristalle legt, die sich sehr schnell darin lösen, deren desinfizierende Wirkung aber nicht über die Kolonie hinausreichen. Dann werden die Platten in den 23°-Schrank zurückgestellt.

XV. Übung: Pneumococcen. c.

Hat man gestern Reinkulturen angelegt, so sieht man auf Gelatine überhaupt kein Wachstum; auf Agar zeigen sich sehr zarte graue Kolonien (Fig. 23), doch gibt es Pneumococcen, die darauf überhaupt nicht wachsen. In der Bouillon zeigt sich geringe Trübung. Man nimmt mit einer sterilen Pipette etwas vom Bodensatz heraus und untersucht im hängenden Tropfen. Die Pneumococcen liegen in kurzen Ketten zusammen.

Ist eine der Mäuse eingegangen, so wird sie mit großer Sorgfalt steril obduziert. Der makroskopische Befund ist wiederum negativ; speziell findet sich keine Pneumonie, sondern der Tod ist an Allgemeininfektion erfolgt. Nur an der Infektionsstelle ist Ödem bemerkbar. — Mikroskopisch zeigt sich derselbe Befund, der oben für das pneumonische Sputum beschrieben wurde (Fig. 24).

Fig. 23. Pneumococckenkolonien auf Agar. 40 : 1.

Fig. 24. Pneumococcen aus dem Blute einer Maus. Färbung nach Gram. 800 : 1.

Aus den Organen gießt man Agarplatten und streicht auf mehrere Röhrchen schrägen Agar und Löfflersches Serum aus; ferner bringt man eine Öse Blut in ein Bouillonröhrchen, ein Stückchen Milz in ein anderes.

Außerdem werden einige sterile Seidenfäden mit Blut getränkt, über Chlorcalcium getrocknet und in einem sterilen Reagenzglas der Sammlung einverleibt: Pneumococcen halten sich auf diese Weise längere Zeit, während sie auf künstlichen Nährböden rasch zugrunde gehen.

Manchmal kommt es vor, daß die mit Speichel infizierte Maus an anderen Bakterien als an Pneumococcen zugrunde gegangen ist. Findet man nur eine Art (z. B. nur dicke, plumpe Stäbchen) im Blut, so werden diese ebenfalls weiter untersucht, außerdem der Versuch mit anderem Speichel wiederholt. Findet man dagegen im Ausstreichpräparat neben anderen Bakterien auch Diplococcen, so ist es wahrscheinlich, daß diese den Tod verursacht, daß sich aber die anderen bei der Injektion in alle Organe gelangten Bakterien in dem durch die Pneumococcen geschwächten Tierkörper vermehrt haben. Um die Pneumococcen rein zu erhalten, impft man mit einem Organstückchen eine andere Maus, doch subkutan mit der Öse, damit den Saprophyten diesmal ungünstigere Vermehrungsbedingungen geboten werden.

Ferner wird pneumonische Lunge von einer Sektion geschnitten und die Schnitte auf Deckgläser aufgeklebt.

XVII. Übung: Bakterien aus der Proteusgruppe. b.

Auf den Gelatineplatten sind sehr viele und verschiedenartige Kolonien gewachsen. Bei 60facher Vergrößerung fallen besonders solche mit langen Ansläufern auf, die sich durch mehrere Gesichtsfelder erstrecken und knäuel- oder zopfförmig gestaltet sind. Bei starker Vergrößerung findet man, daß es Stäbchen sind. Man legt von einer Stelle, wo sicher keine andere Kolonie liegt, Gelatinestich- und -strich, Agarstich- und -strich, Kartoffel-, Milch- und Bouillonkultur an. — Auf den Agarplatten sind keine derartigen Kolonien zu sehen: die Bakterien sind auch darauf gewachsen, doch sind ihre Kolonien, wie die der meisten Mikroorganismen, auf Agar viel weniger charakteristisch als auf Gelatine.

Das Rinderserum wird wie gestern sterilisiert.

33. Tag.

XII. Übung: Desinfektion. i.

Wie am 32. Tag.

XIV. Übung: Wasseruntersuchung. d.

Auf nengewachsene verflüssigende Kolonien werden Kaliumpermanganatkristalle gelegt.

XV. Übung: Pneumococcen. d.

Auf den aus der Maus angelegten Kulturen ist das früher beschriebene Wachstum erfolgt. Die Kolonien werden weiter untersucht. Besonders ist bei der Bouillon darauf zu achten, ob nur Pneumococcen darin gewachsen sind.

Die gestern angefertigten Schnitte werden von Paraffin befreit und in der früher geübten Weise teils mit Fuchsin, teils nach Gram unter Vorfärbung mit Lithionkarmin, teils nach Weigert (XI. Übung b) ebenfalls unter Vorfärbung mit Lithionkarmin gefärbt und zuerst bei schwacher, dann bei starker Vergrößerung betrachtet. Die Alveolen sind von einem an Epithelien, roten und weißen Blutkörperchen mehr oder minder reichen Exsudat ausgefüllt: das Fibrin, das bei der Weigertschen Färbung in der gleichen dunkelvioletten Farbe wie die Coccen gefärbt ist, bildet in ihnen dichte Netze, die miteinander durch Fäden, die die Alveolarwand durchsetzen, in Verbindung stehen. In dem Exsudate sind zahlreiche Pneumococcen sichtbar, besonders da, wo es zellreich ist, da die Leukocyten von den Coccen angelockt werden. Im Stadium der grauen Hepatisation ist ausgebreitete Phagocytose zu sehen. In den Fuchsinpräparaten sind manchmal die Kapseln der Coccen mitgefärbt.

XVII. Übung: Bakterien aus der Proteusgruppe. c.

Die Gelatine wird von manchen Bakterien dieser Gruppe verflüssigt, von anderen nicht. Stets gehen aber von dem Stich zahlreiche Äste in den Nährboden. Die Agar- und Kartoffelkulturen sind uncharakteristisch: die Bouillon ist gleichmäßig getrübt, die Milch geronnen.

XVIII. Übung.

Zum Schlusse des ersten Teiles wird dem Praktikanten eine Maus übergeben, die an einer Infektionskrankheit gestorben ist, deren Erreger ihm noch unbekannt ist. Seine Aufgabe ist es, den betreffenden Mikroorganismus herauszuzüchten und seine ätiologische Bedeutung nachzuweisen.

Ferner ist das Rinderserum wie vorher zu sterilisieren.

In den nächsten Tagen sind die von der Desinfektion stammenden Kulturen bis zum 7., die Bouillon bis zum 21. Tage zu beobachten, ferner sind die Wasserplatten am 7. Tage nochmals zu zählen. Beide können dann beseitigt werden.

34. Tag.

Fortsetzung der Übung XVIII.

Das Rinderserum wird ohne weiteren Zusatz in sterile Reagenzgläser verteilt, bei 70° schräg erstarren gelassen und in den Brutschrank gestellt; sollten sich Keime entwickeln, so wird das Röhrchen ausgeschaltet.

Für den übernächsten Tag ist 1 l Milch zu besorgen; ferner ist je eine Kultur von Typhus, Pyocyaneus und Prodigiosus auf schrägem Agar anzulegen und die beiden ersten bei 37°, die letzte bei 22° aufzubewahren.

II. Hälfte des Kurses.

36. Tag.

VII. Übung: Tuberkulose. b.

Das vor etwa 3 Wochen infizierte Meerschweinchen wird gewogen, um den Gewichtsverlust festzustellen, und mit Chloroform getötet. Die Sektion muß mit sterilen Instrumenten besonders sorgfältig vorgenommen werden, da die Tuberkelbazillen sehr langsam wachsen und infolgedessen leicht überwuchert werden. Die Infektionsstelle ist, wenn Material unter die Haut gelangt ist, aufgebrochen. Die vergrößerten Inguinaldrüsen sind dann auch von außen gut zu fühlen. Nach der Eröffnung findet man die Infektionsstelle stark verkäst, die Inguinaldrüsen von verkästen Knötchen durchsetzt. Ist kein Material unter die Haut gelangt, so fehlen diese Veränderungen. Die Bauchorgane, besonders Leber und Milz, sind stark vergrößert und mit Tuberkeln durchsetzt; die großen Herde in diesen Organen haben Ähnlichkeit mit anämischen Infarkten. Das Netz hat sich zusammengerollt und ist im Innern zu einer käsigen Masse umgewandelt, außen mit Knötchen besetzt. Das Peritoneum und seine Lymphdrüsen sind ebenfalls stark erkrankt. Auch in der Lunge sind graue Tuberkel sichtbar. Die Organe werden herausgenommen und mikroskopisch (Ausstrich und Schnitt) und kulturell untersucht. Die Färbung im Ausstrichpräparate geschieht nach Ziehl (s. VII. Übung a). Man sieht zwischen den blaugefärbten Zellen viele Tuberkelbacillen. Zur kulturellen Untersuchung schneidet man einen etwa linsengroßen Herd mit einer sterilen Schere in viele sehr kleine Stücke und verreibt sie mit der Öse auf einem der bei 70° erstarrten Serumröhrchen. In dieser Weise legt man 5–6 Kulturen an. Die Röhrchen werden mit Paraffin zugeschmolzen und in den Brutschrank gestellt. Außerdem verreibt man Organstückchen auf ausgegossene Glycerinagarplatten. Damit diese nicht austrocknen, stellt man sie umgekehrt in eine große Schale, auf deren Boden man einen mit Sublimatlösung getränkten Wattebausch bringt. Täglich muß kontrolliert werden, ob noch genügend Flüssigkeit vorhanden ist. Brutschrank.

Der Rest der Organe wird in Sublimat fixiert: die Stücke, die nicht breiter als $\frac{1}{2}$ cm sein dürfen, kommen für 5 Stunden in konzentrierte Sublimatlösung, dann in 60% Alkohol, dem Jod bis zu madeira-ähnlicher Farbe zugesetzt worden ist, so lange, bis er sich nicht mehr entfärbt (mindestens 48 Stunden), dann wie früher in 60%, 96% abs. Alkohol und werden in Paraffin eingebettet.

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. b.

Wenn das Kaninchen sein ursprüngliches Gewicht wieder erlangt hat, wird 1 Öse Typhuskultur in 1 cem physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und (ohne abzutöten) intravenös injiziert.

XIX. Übung: Prodigiosus. Pyocyaneus. a.

Die Kenntnis des Bac. prodigiosus ist notwendig, da dieser Mikroorganismus wegen seines charakteristischen Wachstums und seiner Unschädlichkeit vielfach zu Versuchen verwendet wird. — Man gießt aus einer Reinkultur Agar- und Gelatineplatten und legt Agarstich und -streich, Gelatinestich, Bouillon- und Kartoffelkultur an; Aufbewahrung bei 23 °/o.

Der Bac. pyocyaneus ist als Erreger des grünen Eiters wichtig. Er steht dem früher (XIII. Übung) aus Wasser gezüchteten Bac. fluorescens sehr nahe. — Dieselben Kulturen wie bei Bac. prodigiosus. — Aufbewahrung bei 37 °, Gelatine bei 23 °.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. a.

Die Züchtung der menschenpathogenen Anaëroben gelingt dem Anfänger nicht leicht; infolgedessen sollen die Methoden zunächst an einer leichter züchtbaren Art geübt werden. Wir nehmen Buttersäurebacillen, die in Milch und Erde sehr verbreitet sind. Um ihre Züchtung zu erleichtern, werden sie zunächst angereichert. — Man füllt eine Flasche mit Patentverschluß oder eine Soxhletflasche mit Milch und bringt etwa 1 g Erde hinein, kocht 20 Minuten im Wasserbad (vom ersten Aufkochen an gerechnet), verschließt und kocht noch 10 Minuten. Dadurch werden die sporenfreien Arten getötet, während die Sporen der Buttersäurebacillen (und der Heubacillen) am Leben bleiben. Die Flasche kommt in den Brutschrank und wird in einen Untersatz gestellt, da sie meist infolge der gebildeten Gase überläuft. Ferner wird ein Papiertrichter darüber gestülpt, um ein Verspritzen der Flüssigkeit zu verhüten. — Der Verschluß darf nicht allzufest sitzen, da sonst die Flasche zerspringen kann.

Für die nächsten Tage ist Zuckeragar und Zuckergelatine (1½ °/o Traubenzucker), sowohl in Röhren mit 15 cem („in hoher Schicht“ für den 38. Tag), als auch in solchen in gewöhnlicher Menge nötig; außerdem Zuckerbouillon.

Ferner werden 3 Kulturen des Vibrio auf schrägem Agar angelegt.

37. Tag.

XIX. Übung: Prodigiosus. Pyocyaneus. b.

Auf sämtlichen Prodigiosuskulturen ist Wachstum roter Kolonien erfolgt; die Plattenkolonien sind klein, die Gelatine wird verflüssigt, die Bouillon gleichmäßig getrübt. Im hängenden Tropfen sind sehr kleine, fast kugelförmige Bacillen zu sehen, zwischen denen minimale Partikelchen des roten Farbstoffes liegen. Dieser ist in Wasser unlöslich, weshalb nur die Kolonien, nicht ihre Umgebung rot gefärbt sind. — Eigenbewegung ist nur bei ganz jungen Kolonien wahrzunehmen. In Fuchsinpräparaten sieht man sehr kurze Bacillen; nach Gram sind sie unfärbbar.

Die *Pyocyaneusbacillen* bilden einen grünblauen Farbstoff, der in die Umgebung diffundiert. Die Gelatine wird verflüssigt, die Kartoffel brann gefärbt, die Bouillon gleichmäßig getrübt und ein Häutchen darauf gebildet. Im hängenden Tropfen sieht man schlanke kurze Stäbchen mit lebhafter Eigenbewegung. Dasselbe Aussehen zeigen sie im Fuchsinpräparat. Die Färbung nach Gram fällt negativ aus.

Die Kulturen werden noch einige Tage beobachtet und dann beseitigt bis auf die, die, neu abgeimpft, in die Sammlung kommen.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. b.

Im Brutschrank verrät ein lebhafter Gestank das Wachstum der Buttersäurebacillen. Die Milch hat sich in Käse und Molke getrennt; aus letzterer steigen Gasblasen auf. Man nimmt mit einer sterilisierten Pipette etwas von der Molke heraus und untersucht im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat. Man sieht zahlreiche bewegliche (doch hier und da auch unbewegliche) große plumpe Stäbchen (Fig. 25), manchmal mit Sporen.

Aus dem Material werden Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten gegossen.

Bei der Züchtung von Anaëroben mache man sich zweierlei zur Regel: Erstens arbeite man möglichst rasch, um die Bacillen dem Luftsauerstoff nicht zu lange auszusetzen. Zweitens gehe man stets von großen Mengen Material aus: viele Anaëroben sind anfangs schwer zu züchten; ist einmal die Kultur gelungen, so ist das Weiterzüchten leicht.

Die Entfernung des Sauerstoffes geschieht am zweckmäßigsten entweder durch Absorption vermittelst alkalischer Pyrogallussäure oder durch Verdrängen mit Wasserstoff. Der Anfänger übe beides. Zum Anlegen von Kulturen unter Pyrogallussäure stellt man zunächst die Utensilien zurecht: „50%“ Kalilauge, 20 g Pyrogallussäure in einem dünnwandigen Becherglas, einen Meßzylinder, drei Glasstäbe, von denen jeder zu einem rechtwinkligen Dreieck gebogen ist, das eine Dose eben ausfüllt, und eine Hammerlsche Dose (Fig. 1). Die Rinne im Deckel der letzteren wird mit Exsikkatorfett ausgefüllt. Auf den Boden kommt eine 16fache Lage von Filtrierpapier, darauf eine leere Petrischale. Dann werden die Platten gegossen; in das erste Röhrchen bringt man mit der Pipette einen Tropfen und legt daraus wie gewöhnlich drei Verdünnungen mit je drei Ösen an. Die gegossenen Platten werden offen in die Dose gestellt, dazwischen die Glasstäbe gelegt. Dann schüttet man 15 cm Kalilauge zu der Pyrogallussäure, schüttelt um, bis sich alles gelöst hat, gießt die entstandene hellbraune Flüssigkeit in die Dose und schließt diese sofort durch Aufsetzen und Andrücken (nicht Drehen) des Deckels. Das pyrogallussaurer Kali absorbiert den Sauerstoff und färbt sich dadurch schwarz; die Absorption geschieht am besten an Oberflächen; um diese zu vermehren, wird das Filtrierpapier zugegeben.

Zur Züchtung unter Wasserstoff ist nötig (Fig. 26): der Kippsche Apparat, eine Glasglocke die in einer Schale auf einigen Blöcken sitzt (Bofkinscher Apparat) und unter ihr ein Drahtgestell mit mehreren

Fig. 25. Buttersäurebazillen.
Ausstrich aus Milch. 800:1.

Etagen, auf deren jede man eine Petrischale setzen kann. Der Kippsche Apparat besteht aus einer oberen großen Kugel, die mittels eines langen Fortsatzes durch eine untere große Kugel in eine Halbkugel eintaucht. In die untere Kugel kommen Zinkstückchen (s. Fig 26). Dann wird die obere aufgesetzt und 25prozentige Schwefelsäure eingegossen. Wird der Hahn geöffnet, so steigt diese zum Zink auf und es strömt Wasserstoff aus. Durch eine dazwischengesetzte Flasche mit alkalischer Pyrogallussäure kann dieser von Spuren von Sauerstoff befreit werden. Der Aufsatz auf dem Kippschen Apparat dient zum Schutz gegen Verspritzen von Säure. Dann wird die Schale des Botkinschen Apparates mit Paraffinum liquidum so weit ausgegossen, daß der Innenraum der Glocke

Fig. 26. Apparat zur Züchtung unter Wasserstoff. Rechts Kippscher Apparat, links Botkinscher Apparat; in letzterem das Drahtgestell zum Einsetzen der Platten. Zwischen beiden Flasche zur Absorption von Sauerstoff.

von der Luft abgeschlossen ist. Die Verbindung stellen nur zwei Kautschukschläuche her, von denen der eine in den oberen, der andere in den unteren Teil der Glocke einmündet. Mit dem äußeren Ende des ersteren wird der Kippsche Apparat verbunden, an den letzten Schlauch ein Glasrohr angesteckt. Die Kautschukschläuche sollen weich sein, damit sie von außen herausgezogen werden können; um sie zu stützen, führt man einen dünnen Draht durch jeden. Dann gießt man wie vorher die Platten, setzt sie offen auf das Drahtgestell, deckt die Glocke (vorsichtig, damit die Schläuche nicht umfallen) darüber und leitet Wasserstoff ein. Dieser verdrängt die atmosphärische Luft. Nach 20 Minuten prüft man, ob diese vollständig entwichen ist: Man stülpt ein Reagenzglas über das ableitende Glasrohr, zieht es ab, hält sofort den Daumen darauf und

zündet das ausströmende Gas in einiger Entfernung vom Apparate an. Gibt es einen kleinen Knall, so ist es noch mit Sauerstoff gemischt; brennt es ruhig, so ist alle Luft verdrängt. Dann schließt man den Hahn des Kippischen Apparates und zieht die Schläuche vorsichtig aus der Glocke. Da auch Paraffinum liquidum etwas Sauerstoff durchläßt, so kann man eine schwache Lösung von frisch bereitetem pyrogallussaurem Kali in die Schale gießen, bis dieses den unteren Rand der Glocke erreicht und außen und innen das Paraffinum liquidum darauf schwimmt.

Die Zuckergelatineplatten werden bei 23°, die Zuckeragarplatten im Brutschrank aufbewahrt.

XXI. Übung: Bacteriolyse. a.

Zur Gewinnung bacteriolytisch wirkenden Vibrionenserums werden die 3 Agarkulturen abgeschwemmt, durch Erhitzen auf 60° abgetötet und einem Kaninchen, das man zuvor gewogen hat, subkutan injiziert.

Für den nächsten Tag sind Schrägagarkulturen von Typhus, Milzbrand, Geflügelcholera, Prodigiosus, Pyocyaneus, Vibrio anzulegen; die Sammlungskulturen, von denen abgeimpft wurde, sind noch aufzubewahren.

38. Tag.

VII. Übung: Tuberkulose. c.

Aus Blöcken von menschlicher Lungentuberkulose werden Schnitte angefertigt und auf Deckgläser aufgeklebt.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. c.

Von außen kann man sehen, daß auf den Agarplatten üppiges, auf den Gelatineplatten fast kein Wachstum stattgefunden hat. Man öffnet das Gefäß, das die ersteren enthält — wenn es die Glasglocke ist, durch vorsichtiges Abheben, wenn es die Hammerlsche Dose ist, indem man den Deckel erwärmt und, wenn das Fett flüssig ist, ihn langsam mit der Hand an einer Seite zu heben sucht. Man sieht zunächst Luftbläschen hineindringen; wenn der innere Druck gleich dem äußeren ist, läßt sich der Deckel leicht aufheben. Vorsicht, daß nicht Fett auf die obere Platte spritzt! Die Platten werden herausgenommen und bedeckt. Man sieht auf den ersten Platten sehr zahlreiche graue Kolonien, die Gas gebildet haben. Auf der dritten und vierten Platte, wo sie mehr einzeln stehen, haben sie einen Durchmesser von 1—2 mm. Bei 60facher Vergrößerung erscheint die Kolonie granuliert, der Rand fein granuliert bis stark gezackt. Einzelne Bacillen sind eben noch sichtbar. Die tief liegenden Kolonien sind wetzsteinförmig. Im gefärbten Deckglaspräparat sieht man lange plumpe Stäbchen. Von mehreren derartigen Kolonien legt man mit einer langen Platinnadel Stichkulturen in Zuckeragar und Zuckergelatine in hoher Schicht an. Von dem oben geschilderten Wachstum und Ansehen der Buttersäurebacillen findet man übrigens oft Abweichungen; die Bacillen variieren sehr stark, weshalb sie zu Studien über Variabilität ein dankbares Material bieten.

XXII. Übung: Involutionsformen. a.

Während im allgemeinen die Bakterien derselben Art das gleiche Aussehen haben, wachsen sie unter bestimmten Bedingungen zu merkwürdigen gequollenen und verzerrten Formen aus. Derartige „Involutionsformen“ kann man leicht durch Zusatz von Lithiumchlorid zum Nährboden darstellen. Man setzt also zu je 7 Röhren mit 10 cem Agar soviel einer 10% Li Cl-Lösung, daß der Nährboden 1,2 und 3% Li Cl enthält und sterilisiert im Dampftopf $\frac{1}{2}$ Stunde. Dann legt man schräg und beimpft mit jeder der gestern angelegten Kulturen drei Röhren. Außerdem legt man eine Kultur von *Prodigiosus* auf Agar an und stellt sie in den Brutschrank (37°).

Anfertigen von Beize zur Geißelfärbung: 5 g Tannin werden in 50 g Wasser gelöst, dann 10 cem einer Ferrosulfatlösung 1:2 und 2,5 cem gesättigte alkoholische Fuchsinlösung dazugegeben. Soll auch die van Ermenghemische Methode versucht werden, so fertigt man noch folgende Beize an: 20 cem einer 20% Tanninlösung werden mit 10 cem einer 2% Osmiumsäurelösung (löst sich langsam) vermischt und 1—2 Tropfen Eisessig dazugegeben.

39. Tag.

XII. Übung: Tuberkulose. d.

Wenn auf den Nährboden üppiges Wachstum erfolgt ist, kann es sich nur um Verunreinigungen handeln; derartige Kulturen sind mikroskopisch zu untersuchen und zu beseitigen.

Die aufgeklebten Schmitte kommen in Xylol, abs. 96%, 60% Alkohol, Wasser und werden dann folgendermaßen gefärbt: Delafield'sches Hämatoxylin 20 Min.; Auswaschen in Wasser $\frac{1}{2}$ Stunde; Färben in Ziehlschem Karbolfuchsin im Brutschrank 1 Stunde; Salzsäurealkohol (1% Salzsäure in 70% Alkohol) 1 Min.; 70% Alkohol 2—3 Min.; Auswaschen in fließendem Leitungswasser 10 Min.; dest. Wasser, 70%, 96%, abs. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Die Bacillen sind rot, die Zellkerne blau gefärbt. Die Details sind an der Hand eines Lehrbuchs der pathologischen Histologie zu studieren.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. d.

In den gestern angelegten Kulturen ist längs des Impfstichs fadenförmiges Wachstum mit Perlen erfolgt, das aber nicht bis zu der Oberfläche reicht. Auch Gasbildung ist eingetreten. Zur Anlegung von Zuckerbouillon- und Milchkulturen kocht man zunächst einige Röhren aus, um den Sauerstoff zu vertreiben, impft sie nach dem Abkühlen mit einer Öse einer Agarstichkultur und stellt sie unter Sauerstoffabschluß entweder unter die Wasserstoffglocke oder in ein Glasgefäß, auf dessen mit Filtrierpapier bedeckten Boden man genau wie neulich eine Lösung von pyrogallussaurem Kali gießt. Der Wattestopfen der Röhren darf nicht zu fest sitzen. Auch kann man die Zuckerbouillon mit Paraffinum liquidum oder Schweineschmalz einige cm hoch übergießen, damit zusammen sterilisieren und dann beimpfen. Derartige Kulturen brauchen nicht besonders anaërob gestellt zu werden; doch eignet sich die Methode nicht für sehr empfindliche Anaërobe. Brutschrank.

XXII. Übung: Involutionsformen. b.

Die gestern angelegten Kulturen werden im fuchsingefärbten Deckglaspräparat untersucht. Zum Vergleich sind aufbewahrte Präparate der normalen Bacillen zu betrachten. Die auf dem Lithionchloridagar gewachsenen Bacillen haben Fäden von unregelmäßiger Dicke gebildet, andere sind zu kugel-, hantel-, hefen-, flaschen- oder wurstartigen Formen umgewandelt. (Fig. 27 und 28). Treten solche Gebilde noch wenig

Fig. 27. Involutionsformen von Cholera vibriolen. 800:1.

Fig. 28. Involutionsformen von Bac. prodigiosus. 800:1.

hervor, so sind die Kulturen in den Brutschrank zu stellen und an den nächsten Tagen (bis zu 14 Tagen) nochmals zu untersuchen.

Schöne Involutionsformen findet man auch in alten Kulturen. Man untersucht daher die Kulturen, von denen am 37. Tage abgeimpft wurde, besonders die Milzbrand- und die Vibriolenkultur mikroskopisch.

XXIII. Übung: Malignes Ödem. a.

Die Bacillen des malignen Ödems sind in gedüngter Gartenerde sehr verbreitet. Sie besitzen besonders in schweren Wunden hohe pathogene Eigenschaften. Man legt einem Meerschweinchen an einer Seite des Bauches eine größere Hauttasche an, die bis in die Muskulatur dringt, und bringt etwa $\frac{1}{2}$ g fein verriebene Gartenerde hinein.

Ferner sind für den nächsten Tag zum Zwecke der Geißelfärbung Schrägagarkulturen von Typhusbacillen und Vibriolen anzulegen und Jauche mit großen Spirillen zu besorgen.

40. Tag.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. e.

In der Bouillon sieht man kleinflockige Trübung und Gasbläschen. Die Milch ist in derselben Weise zersetzt wie die, die als Ausgangsmaterial gedient hatte. Die Gläser werden geöffnet, wobei man wieder den starken Geruch nach Buttersäure wahrnimmt, und die Kulturen mikroskopisch untersucht.

In den Gelatinestichkulturen ist längs des Stiches Wachstum kleiner Perlen oder Verflüssigung zu erkennen; das Wachstum ist noch stärker anaërob als in den Agarstichkulturen.

XXIV. Übung: Geißelfärbung.

Zum Gelingen der Geißelfärbung sind vor allem reine Deckgläser nötig. Dieselben dürfen noch nicht benutzt gewesen sein. Vor dem Gebrauch sind sie mit Alkohol zu übergießen und dieser abzubrennen. Ferner sind alle Pinzetten, mit denen sie gefaßt werden, vorher zu reinigen und auszuhülen.

Die für den Anfänger einfachste Methode der Geißelfärbung ist die nach Bunge-Coerner-Fischer. Die Beize (s. 38. Tag) muß mindestens 1 Tag alt sein. Die Spirillen in Jauche können ohne weiteres gefärbt werden; von den Reinkulturen macht man zunächst in einem Reagenzglas eine dünne Aufschwemmung in destilliertem Wasser, wobei man darauf zu achten hat, daß beim Abpipfen der Nährboden nicht berührt wird. Zur Färbung bringt man eine Öse auf ein Deckglas, verteilt, läßt lufttrocken werden, bringt Beize darauf und erwärmt ohne Kochen zwei Minuten. Abspülen mit Wasser, Nachfärben unter Erwärmen mit verdünntem Karbolfuchsin, Abspülen mit Wasser, Trocknen, Zedernöl. Zunächst färbt man die Spirillen in Jauche, da sich deren Geißeln am leichtesten darstellen lassen, dann die Typhusbacillen und Vibrionen. Man

Fig. 29. Spirillen mit Geißeln.
800 : 1.

Fig. 30. Typhusbacillen mit
Geißeln. 800 : 1.

sieht an den Spirillen (Fig. 29) dichte Büschel von Geißeln, und zwar an beiden Enden (lophotrich); die Typhusbacillen (Fig. 30) sind allseitig von vielen wellenförmig geschlängelten Geißeln umgeben (peritrich), die Vibrionen haben meist (Choleravibrionen stets) nur eine endständige Geißel (monotrich). Die Bacillen erscheinen größer als bei dem gewöhnlichen Färbeverfahren. Außerdem sieht man im Gesichtsfeld mehr oder minder zahlreiche abgerissene Geißeln und auch Farbstoffniederschläge. Meist sind nicht alle Stellen des Präparates gleich gut gefärbt. Ist die Färbung mißlungen, so achte man zunächst darauf, ob man die Vorschrift genau befolgt hat. Meist liegt die Ursache an ungenügend gereinigten Deckgläsern. Außerdem kann die Beize zu jung oder zu alt oder die Bacterienaufschwemmung zu dicht sein.

Ist diese Geißelfärbung gut gelungen, so kann noch die nach van Ermenghem versucht werden. Man fertigt die Präparate aus den Reinkulturen wie vorher mit großer Sorgfalt an, beizt mit der Osmiumbeize über der Flamme, doch ohne zu kochen (bei etwa 50—60°) 5 Minuten (oder in der Kälte 30 Minuten), spült in Wasser, dann in abs. Alkohol ab, taucht 3 Sekunden lang in eine 1/2prozentige Lösung von Argentinum

nitricum, dann ohne abzuspülen in folgende Lösung: Acid. gallicum 5,0; Tannin 3,0; Natr. acet. fus. 10,0; Aq. dest. 350,0 einige Sekunden lang. Dann bringt man es in die Argentum nitricum-Lösung zurück und bewegt es darin herum, bis die Lösung sich zu schwärzen beginnt; Abspülen mit Wasser, Trocknen, Zedernöl. Die Bacillen und Geißeln sollen schwarz, nicht braun oder gelb sein. Mißglückt die Färbung, so ist sie nach einigen Tagen, wenn die Beize älter ist, zu wiederholen.

41. Tag.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. f.

In den Zuckergelatinestichkulturen ist das Wachstum und die Verflüssigung fortgeschritten. Das Glas mit den Zuckergelatineplatten wird geöffnet. Auch in ihnen hat sich Gas gebildet. Die Kolonien der Butter säurebacillen bestehen bei 60facher Vergrößerung aus verfilzten Fäden; sie verflüssigen die Gelatine. Einige von ihnen werden mikroskopisch untersucht und auf Zuckeragar und Zuckergelatine in hoher Schicht abgestochen. Außer ihnen können auf der Platte noch andere sporentragende Stäbchen gewachsen sein.

XXIII. Übung: Malignes Ödem. b.

Die mit malignem Ödem infizierten Meerschweinchen pflegen nach 1—2 Tagen einzugehen. An der Infektionsstelle hat sich eine weit ausgebreitete Schwellung gebildet; Knistern ist selten wahrnehmbar. Da die Verbreitung der Bacillen nicht auf dem Blutwege, sondern auf dem Lymphwege geschieht, so sind in den inneren Organen höchstens vereinzelte Bacillen zu erwarten und das Hauptgewicht auf die Untersuchung des Ödems zu legen. An der Infektionsstelle selbst sind sehr viele Arten von Bakterien vorhanden; je weiter weg, desto reiner treten die Ödembazillen hervor. Um daher das Material nicht zu verunreinigen, führt man bei der Sektion (nach Übergießen des Felles mit Alkohol) den Schnitt so, daß er von dem entferntesten Punkt des Ödems zur Infektionsstelle geht und nur die Haut spaltet; dann nimmt man ein neues Messer und präpariert in derselben Weise die Haut ab. Das Unterhautzellgewebe und die Muskulatur sind blutig serös infiltriert. Einen Teil davon nimmt man heraus; die übrige Leiche läßt man zugedeckt liegen, da die Bacillen auch noch nach dem Tode weiterwuchern. Die Untersuchung im hängenden Tropfen ergibt lebhaft bewegliche große Bacillen von der Größe des Milzbrandbacillus, die meist in Ketten liegen oder lange Fäden bilden. Auch Sporen werden (im Gegensatz zum Milzbrandbacillus) im Tierkörper gebildet. Außerdem finden sich als Verunreinigung mehr oder weniger zahlreiche kleinere Stäbchen und Coccen. Dann werden Deckglasausstrichpräparate mit Fuchsin und nach Gram gefärbt. Die Gramsche Färbung ist nur bei kurzer Entfärbung positiv. Von Kulturen werden Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten mit nicht zu wenig (einige Ösen) Material gegossen und anaërob (d. h. unter Wasserstoff oder in Pyrogallussäuredosen) gestellt. Ferner werden Schüttelkulturen in hoher Schicht angelegt, d. h. es werden 5—6 Röhren mit Zuckeragar in hoher Schicht verflüssigt, in das erste einige Ösen Ödem gebracht und wie beim Plattengießen von hier aus das zweite, von diesem aus das dritte infiziert,

nun aber nicht ausgegossen, sondern in den Röhrechen erstarren gelassen. Der Rest des Materials wird in Formalin eingelegt und in gewohnter Weise zu Schnittpräparaten weiterbehandelt (s. 48 Tag).

XXV. Tetanus. a.

Auch die Tetanusbacillen sind in gedüngter Gartenerde meist vorhanden. Bringt man daher einem Tiere so wenig davon unter die Haut, daß es nicht mehr an malignem Ödem stirbt, so geht es nach etwas längerer Zeit an Tetanus ein. Man impft zu diesem Zweck eine Maus mit einer Öse voll Gartenerde subkutan, über der Schwanzwurzel, doch nicht genau in der Mitte.

42. Tag.

Vakat.

43. Tag.

XX. Übung: Methoden der Anaërobenzüchtung. g.

Die aus den Gelatineplatten abgeimpften Kulturen werden betrachtet, ob sie mit den früher gewonnenen übereinstimmen. Ist dies der Fall, so können sämtliche Buttersäurebacillenkulturen (außer den zum Aufbewahren bestimmten) beseitigt werden.

XXIII. Übung: Malignes Ödem. c.

Ebenso wie die Buttersäurebacillen können die Ödembacillen stark variieren, weshalb von der folgenden Beschreibung auch Abweichungen vorkommen können.

Die Kolonien auf Zuckeragar sind 1—2 mm groß, die oberflächlichen rund, die tiefliegenden wetzsteinförmig. Bei 60facher Vergrößerung ist der Rand fein granuliert oder zeigt zahlreiche, dicht verfilzte Ausläufer. Einzelne Bacillen sind eben sichtbar. — Außerdem sind noch andere kleine Bacillen und Coccen gewachsen. Findet man keine Ödembacillen, so untersucht man die inneren Organe des Tieres, wo sie nun in größerer Zahl und reiner vorhanden sind, und gießt nochmals Platten daraus.

Die Ödembacillenkulturen werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. — Aus einigen Kolonien werden Stichkulturen in Zuckeragar und Zuckergelatine (hohe Schicht) gemacht. Ferner werden Bouillonkulturen und Strichkulturen auf erstarrtem Serum (auch Löfflersches Serum kann genommen werden) angelegt und anaërob gestellt.

In den Schüttelkulturen in hoher Schicht haben sich zunächst zahlreiche, weiterhin spärlichere Kolonien in der Tiefe entwickelt und reichlich Gas gebildet. Will man diese abimpfen, so muß man die ganze Agarstange herausholen. Zu diesem Zweck kann man das Reagenzglas nach äußerlicher Desinfektion in einer sterilen Schale mit einem sterilen Instrumente zerschlagen; oder man erhitzt das Reagenzglas erst oben, dann nach unten gehend, bis der Agar am Glase flüssig ist, worauf man

ihn in eine sterile Schale anstreten läßt. Dann sucht man einzelne Kolonien mit der Nadel abzuimpfen.

Von dem liegengelassenen Tier werden die der Infektionsstelle benachbarten Organe mikroskopisch auf Ödembacillen untersucht. Findet man solche, so legt man die Organe ein, da man das Eindringen der Bacillen auf dem Lymphwege im Schnitt sehr gut verfolgen kann.

XXV. Tetanus. b.

Bei der Maus läßt sich bald ein lokaler Tetanus beobachten, der die der Infektionsstelle nächstgelegene Extremität betrifft. In den nächsten Tagen schreitet die Erkrankung auf die übrigen Muskeln fort.

XXVI. Influenza. a.

Das zähe, glasig aussehende Sputum wird in eine Petrischale ausgegossen; zur Untersuchung werden die eitrigen Partikelchen darin genommen. Die mikroskopischen Präparate färbt man am besten mit stark (etwa 40fach) verdünntem Karbolfuchsin 5–10 Minuten. Die Influenzabacillen erscheinen dann als sehr kleine Stäbchen, so lang wie ein Milzbrandbacillus breit ist, die in typischen Fällen in großen Mengen in (Fig. 31) oder, zu Zügen angeordnet, zwischen den Leukocyten liegen. Außerdem sieht man, besonders wenn das Sputum aus dem Nasenrachenraum stammt, noch andere Bakterien, Pneumococcen, Streptococcen etc., die aber sämtlich länger oder dicker als die Influenzabacillen sind. — Zur Züchtung wird blutbestrichener Agar verwendet. Man stellt sich diesen her, indem man Agarröhrchen schräg erstarren läßt (ausgegossene Platten werden zu schnell trocken) und sie mit einigen Ösen Blut bestreicht. Das Blut gewinnt man aus der eigenen Fingerkuppe: nach gründlichem Abreiben mit 60% Alkohol macht man einen schnellen Strich mit einer vorher ganz kurz abgeglühten Stecknadel und vergrößert den heraustretenden Blutstropfen durch Pressen des Fingers oder Schlenkern des Armes. — Auch Kaninchenblut oder Taubenblut (Entnahme des ersteren aus einer Ohrvene, des letzteren aus der Flügelvene nach Rupfen und Desinfektion der Entnahmestelle) ist gut zu verwenden. — Das Blut wird mit der Öse auf den Nährboden übertragen und verrieben. Dann wird eines der eitrigen Partikelchen aus dem Sputum auf mehreren solchen Röhrchen verrieben, indem man mit derselben Öse ohne abzuglühen darüberstreicht. — Ein Kontrollröhrchen mit Blutagar wird mit Streptococcen infiziert; ferner wird etwas Influenzasputum auf einige Röhrchen mit gewöhnlichem Agar verstrichen.

Fig. 31. Influenzabacillen. Ausstrich aus Sputum, 800:1.

44. Tag.

XXIII. Übung: Malignes Ödem. d.

In der Zuckeragarstichkultur hat üppiges Wachstum stattgefunden, das sich vom Stichkanal aus in den Nährboden erstreckt, aber niemals

die Oberfläche erreicht. Die Gasbildung ist stark. In der Zuckergelatine ist das Wachstum noch gering. Ferner werden die jetzt drei Tage alten Gelatineplatten untersucht. Die Kolonien sind grau und haben einen Durchmesser von $\frac{1}{2}$ —1 mm: bei schwacher Vergrößerung sehen sie wie die Gelatinekulturen der Buttersäurebacillen aus. Außerdem sind noch mehr oder weniger zahlreiche verunreinigende Keime gewachsen. Anlegen einiger StICKkulturen.

Aus einer der AgarstICKkulturen wird die Agarstange in der vorher (43. Tag) angegebenen Weise entfernt mit einem sterilen Messer der Länge nach aufgeschnitten und mikroskopisch untersucht. Speziell soll die Kultur auf Geißeln gefärbt werden, was in der früher angegebenen Weise zu geschehen hat. Die Geißeln sind sehr zahlreich und stehen perithrich. Auch Sporen können wie beim Milzbrandbacillus gefärbt werden, wenn man solche im hängenden Tropfen gesehen hat. Will man mit der Reinkultur einen Tierversuch machen, so bringt man sie nicht allein, sondern mit sterilisiertem Quarzsand, durch Ausglühen in einer Porzellanschale sterilisierter Erde u. ä. vermischt ein.

XXVI. Übung: Influenza. b.

Die Influenzokolonien erscheinen auf dem Blutagar als sehr kleine, ganz durchsichtige Pünktchen; auf dem gewöhnlichen Agar fehlen sie: nur selten ist ihnen hier ein kümmerliches Wachstum durch den Schleim und die Symbiose mit anderen Bakterien ermöglicht. Man betrachtet sie am besten mit der Lupe in der früher (V. Übung c) angegebenen Weise, wobei sie ganz durchsichtig erscheinen. Zum Vergleiche nimmt man das gestern ebenfalls angelegte Röhrchen mit Streptococcen, deren Kolonien etwas getrübt aussehen. Außer den Influenzabacillen sind aus dem Sputum noch einige andere Mikroorganismen gewachsen. Die Influenzabacillen werden im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparat untersucht. Sie erscheinen wieder als sehr kleine Stäbchen, die allerdings öfters zu Fäden anwachsen, und besitzen keine Eigenbewegung. Nach Gram sind sie unfärbbar. Man impft von einigen Kolonien auf gewöhnlichen Agar und auf Blutagar ab.

Ferner ist eine Schrägagarkultur von *Bac. enteritidis* Gärtner anzulegen: für den übernächsten Tag ist Eiter von einer frischen, noch unbehandelten Gonorrhöe und, wenn möglich, von einer Sektion von epidemischer Cerebrospinalmeningitis stammender Eiter oder durch Lumbalpunktion gewonnene Cerebrospinalflüssigkeit zu besorgen.

45. Tag.

XXIII. Übung: Malignes Ödem. e.

Das Gefäß mit der Bouillon und der Serunkultur wird geöffnet, wobei der intensive Anaërobergeruch auffällt. Die Bouillon ist stark getrübt mit dickem Bodensatz; das Serum ist da, wo die Bacillen wachsen, verflüssigt, wodurch tiefe Löcher entstanden sind.

XXV. Übung: Tetanus. c.

Die mit tetanusbacillenhaltiger Erde geimpften Mäuse pflegen nach vier Tagen einzugehen. Wie erwähnt, tritt der Tetanus zunächst lokal

auf und verbreitet sich dann auf die übrigen Muskeln. Schließlich tritt die charakteristische Robbenstellung ein: die Vorderbeine sind adduziert, die Hinterbeine gestreckt. Die Bacillen bilden an der Infektionsstelle ein intensives Gift, breiten sich aber nicht über den Körper aus: Untersuchung der inneren Organe ist daher nicht nötig. Nach Abpräparieren der Haut von der Infektionsstelle fertigt man von dieser ein mikroskopisches Präparat an. Man findet darin die Tetanusbacillen als Stäbchen von der Länge eines Milzbrandbacillus aber dünner, mit an einem Ende stehender Spore (Köpfchenspore oder Trommelschlägelform). Färbung nach Gram ist positiv. Außer diesen finden sich noch viele andere Bakterien aller Art darin; andere Stäbchen von größerer Dicke mit Köpfchen-sporen sind nicht Tetanusbacillen (Fig. 32).

Die Isolierung der Tetanusbacillen ist wegen der Anwesenheit der anderen Bakterien ziemlich schwierig, besonders wenn erstere in geringer Zahl vorhanden sind. Um wenigstens einen Teil der vermehrenden Bakterien, nämlich die nichtsporenbildenden zu entfernen, schabt man möglichst viel von der Infektionsstelle ab, bringt es in ein Reagenzglas, dessen Kuppe man mit sterilisierter physiologischer Kochsalzlösung gefüllt hat und hält dies 1 Stunde lang in einem Wasserbade von 65°. Daraus gießt man Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten und legt Kulturen in hoher Schicht (wie in Übung XXIII b) an. Die Zuckergelatineplatten werden mit den aus *Bac. botulinus* (s. unten XXVII. Übung a) gegossenen Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten zusammen unter Sauerstoffabschluß bei 23°, die Agarplatten im Brutschrank aufbewahrt.

Fig. 32. Ausstrich von der Infektionsstelle einer an Tetanus gestorbenen Maus. Links und etwas rechts von der Mitte schlanke Tetanusbacillen mit Köpfchen-sporen, mitten dicke Erdbacillen, ebenfalls mit Köpfchen-sporen.

XXVI. Übung: Influenza. c.

Auf den Blutagarröhrchen ist wieder dasselbe Wachstum erfolgt wie oben beschrieben. Auf dem Agar ohne Blut dagegen ist das Wachstum ausgeblieben. Ist es doch erfolgt, so überzeuge man sich zunächst, ob die Kultur wirklich aus kleinsten Stäbchen besteht; ist dies der Fall, so impft man nochmals auf gewöhnlichen Agar ab, da immerhin Spiren von Blut von der Ausgangskolonie überimpft worden sein und das Wachstum ermöglicht haben können.

XXVII. Übung: *Bac. botulinus*. a.

Auch der *Bac. botulinus*, der Erreger der nervösen Form der Fleischvergiftung, ist ein Anaërobie. Am besten geht man von der Reinkultur aus; doch kann man auch versuchen, ihn aus Schweinekot zu züchten, in dem er schon einmal gefunden worden ist. Man gießt aus der Reinkultur (Entfernen des Agars aus dem Röhrchen ist natürlich nicht nötig; Hineinlangen mit einer Öse genügt) Zuckeragar- und Zuckergelatineplatten, die man (mit den Tetanuserregerplatten zusammen) unter Sauerstoffabschluß bei 23° aufbewahrt; ferner legt man eine Zuckerbouillonkultur ebenfalls anaërob (Nährboden erst auskochen und rasch

abkühlen), Zuckeragarstich und Zuckergelatinestich, an, die ebenfalls bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, da der Bac. botulinus im Brutschrank manchmal schlecht wächst.

XXVIII. Übung: Bac. enteritidis. a.

Mit dem Bac. enteritidis, dem Erreger der gastrointestinalen Form der Fleischvergiftung, wird eine Maus gefüttert: man schwemmt die gestern angelegte Schrägagarkultur mit etwas Wasser ab und trinkt damit ein Stückchen Brot, das man der Maus zu fressen gibt. Krankheitserscheinungen sind erst nach einigen Tagen zu erwarten. Will man schneller vorgehen, so impft man eine andere Maus subkutan mit einer Öse; der Tod tritt dann nach $\frac{1}{2}$ —2 Tagen ein.

Ferner wird je eine Schrägagarkultur von Rotzbacillen und Milzbrandbazillen angelegt; außerdem ein Glaszylinder, etwa von der Größe eines Meßzylinders zu 100 cem, mit Watteverschluß versehen und sterilisiert, ebenso einige Seidenfäden zum Unterbinden von Gefäßen.

46. Tag.

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. c.

Etwa 10 Tage nach der letzten Injektion, wenn das Gewicht des Kaninchens wieder ebenso hoch ist wie anfangs, wird das Blut entnommen. Nötig sind dazu sterile Instrumente, der gestern sterilisierte Meßzylinder und die Seidenfäden. Das Tier wird vorsichtig narkotisiert und auf das Gestell mit dem Rücken nach unten aufgebunden. Dann schneidet man die Haare über der Trachea vom Kehlkopf bis zum oberen Ende des Sternums kurz ab, rasiert und desinfiziert. Hierauf werden Schnitte in der ganzen Länge des Operationsfeldes genau in der Mittellinie geführt, bis man die Trachea freigelegt hat. Blutungen werden mit Liq. ferri sesquichlorati gestillt. Gleich neben ihr, nur wenig weiter hinten, findet man die Carotis, die man an der hellroten Farbe und dem Pulsieren erkennt; ihre Dicke beträgt 1—2 mm. Sie wird in möglichster Länge, mindestens 3 cm freipräpariert, dann am oberen Ende doppelt unterbunden; den oberen Faden schneidet man kurz ab, den unteren läßt man lang und schneidet das Gefäß zwischen den Unterbindungen durch. Nun faßt man den langen Faden mit der Pinzette, legt mit seiner Hilfe das zentrale Ende des Carotis in den sterilisierten Glaszylinder und schneidet es mit einer feinen Schere nahe an dem Faden halb durch, worauf das Blut in starkem Strahl in das Glas spritzt. Das Tier wird vollständig entblutet; am Schluß kann man durch Herzmassage der sinkenden Herzkraft nachhelfen. Nach 2 Stunden wird das Blut mit einem sterilen Glasstab von der Wand des Gefäßes abgelöst und über Nacht an einem kühlen Orte aufbewahrt.

XXIX. Übung: Meningococcen. a.

Außer dem Micrococcus meningitidis sind noch andere, in früheren Übungen behandelte Mikroorganismen, besonders Pneumococcen, imstande, Meningitis zu erregen. Doch sei im folgenden angenommen, daß das zu untersuchende Material von einer durch erstgenannten hervorgerufenen Erkrankung stammt. Man sieht im Ausstriche aus dem Eiter

Coccen, die entweder zu zweien oder zu vierten zusammenliegen; letztere Lagerung ist stets tetraden-, niemals kettenförmig. Auch bei den Diplococcen achte man darauf, ob nicht jedes einzelne Individuum noch eine feine Trennungslinie zeigt, die senkrecht zu der Trennungslinie der beiden Coccen steht. Die einzelnen Individuen sind gegeneinander abgeplattet, wodurch bei Paaren die Semmel- oder Kaffeebohnenform entsteht. Sehr viele liegen in Leucocyten (Fig. 33). Ferner sieht man oft gequollene, etwas schlechter färbbare Formen. Die Färbung nach Gram ist negativ, eine Eigenschaft, die von den wichtigen bei uns vorkommenden Coccen nur noch der *Gonococcus* mit ihnen gemeinsam hat. Zum Anlegen von Kulturen bestreicht man mit je einer Öse Agarplatten, Blutagarplatten und Löfflersches Serum.

Steht kein von Meningitis cerebrospinalis epidemica stammendes Material zur Verfügung, so legt man dieselben Kulturen ans einer Sammlungskultur an.

XXX. Übung: Gonococcen. a.

Aus dem Trippereiter fertigt man mit Fuchsin, Methylenblau und nach Gram mit Gegenfärbung von Safranin gefärbte Deckglaspräparate an. Das Bild ist genau dasselbe wie bei den Meningococcen (Fig. 34), die Färbung nach Gram ist ebenfalls negativ. Ferner färbt man mit folgender Lösung: Methylgrün 0,15; Pyronin 0,5, 96% Alkohol 5,0, Glycerin 20,0, 2% Karbolwasser ad 100; filtra. 2 Minuten. Abspülen mit Wasser. Die Züchtung soll der Anfänger nur mit Eiter einer frischen

Fig. 34. Gonococcen aus Trippereiter.
800:1.

Fig. 33. Meningococcen aus durch Lumbalpunktion gewonnenem Eiter. 800:1.

Gonorrhöe versuchen, bei der er mikroskopisch Gonococcen leicht nachweisen kann. Der beste Nährboden ist eine Mischung von Agar und menschlichem Serum oder Aszitesflüssigkeit zu gleichen Teilen. Man verflüssigt mehrere Röhrehen mit etwa 5 cem Agar, läßt auf etwa 40° abkühlen, erwärmt die andere Flüssigkeit währenddem auf dieselbe Temperatur, mischt beides und legt schräg oder gießt in Platten aus. Nach dem Erstarren wird darauf eine Öse Eiter verstrichen.

XXXI. Übung: Rotz. a.

Da das Arbeiten mit Rotzbacillen mit besonderen Gefahren verbunden ist, so kann es nur solchen Praktikanten gestattet werden, deren Zuverlässigkeit erprobt ist.

Von der gestern angelegten Rotzkultur werden 2 Ösen in 2 cem physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und 1 cem davon einem männlichen Meerschweinchen (die Hoden sind von außen deutlich zu fühlen) intraperitoneal injiziert (vgl. VII. Übung a). Die Injektion geschieht wieder mit abgestumpfter Kanüle; damit kein Hautgeschwür entsteht, ist die Spitze vor der Injektion mit etwas mit der Pinzette gehaltener Watte abzuwischen. Die Injektionsstelle ist mit Kollodium zu verkleben; ein Verstreuen der Streu aus dem Käfig ist zu verhindern. Die erste Krankheitserscheinung ist die Hodenschwellung; da sie diagnostisch sehr wichtig ist, sind die Hoden täglich abzutasten.

Ferner ist eine weiße Maus mit einer kleinen Öse Milzbrand subkutan an einer Stelle zu infizieren, unter der nicht direkt Knochen liegt, da die Infektionsstelle zu Schnittpräparaten verwendet werden soll.

Außerdem sind für den nächsten Tag 15—20 cem steriles defibriertes Rinderblut zu besorgen.

47. Tag.

XIII. Übung: Herstellung von Typhusserum. d.

Das ausgeschiedene Serum wird in sterile Reagenzgläser verteilt.

XXI. Übung: Bacteriolyse. b.

Wenn das Kaninchen sein erstes Gewicht wieder erreicht hat, wird ihm eine ganze Öse Vibrionenkultur intravenös injiziert.

XXIII. Übung: Malignes Ödem. f.

Die Gelatinestichkulturen haben sich in der Tiefe verflüssigt und bilden unten in der verflüssigten Zone einen Bodensatz. — Die sämtlichen Kulturen können beseitigt werden.

XXV. Übung: Tetanus. d.

Auf den Agarplatten sind infolge der Erhitzung nur sporentragende Stäbchen gewachsen. Die Tetanuskolonien sind, je nach dem Befund im mikroskopischen Präparate, mehr oder minder spärlich. Bei 60facher Vergrößerung sieht man von einem dichten Zentrum dünne Fäden radiär ausgehen. Verdächtige Kolonien werden im gefärbten Präparate untersucht und wenn sie aus Stäbchen mit Köpfchensporen bestehen, auf Mäuse übergeimpft. Da auf diese Weise Gift mit übertragen wird, pflegen die Tiere wesentlich schneller zu erkranken und einzugehen als bei Impfung mit Erde.

Die Gelatineplatten werden erst später untersucht.

XXIX. Übung: Meningococcen. b.

Auf den Agar- und Blutagarplatten erscheinen die Meningococcenkolonien etwa 2 mm groß und sehr hell grau; gegen das Licht gehalten und mit der Lupe untersucht sind sie fast so durchsichtig wie Influenzokolonien. Bei 60facher Vergrößerung erscheinen sie fein granuliert. Auf dem Löfflerschen Serum haben sie dasselbe Aussehen. — Im ge-

färbten Deckglaspräparat sieht man wieder Diplokokken von der charakteristischen Gestalt, oft noch mit einer feinen, senkrecht zur ersten stehenden Trennungslinie, Tetraden und Verbände solcher. Die Färbung nach Gram ist bei der üblichen Entfärbung negativ. — Man legt daraus Gelatinestich, Agarstich, Agarstrich und Bouillonkultur an; letztere muß sehr ruhig stehen, damit sich auf der Oberfläche ein Häutchen bilden kann.

XXX. Übung: Gonococcen. b.

Die Kolonien haben einen Durchmesser von $\frac{1}{2}$ —1 mm, sind rund und grau. Bei 60facher Vergrößerung erscheinen die Kolonien durchsichtig, der Rand sehr fein granuliert; auch Kulturen auf schrägem Serumagar sind bei dieser Vergrößerung zu betrachten, indem man das Röhrchen mit der Agarseite nach oben unter das Mikroskop legt. Im gefärbten Deckglaspräparate sieht man wieder semmelförmige Diplococcen oder Tetraden. — Um sich zu überzeugen, ob es wirklich Gonococcen sind, impft man einige Kolonien auf Agar über, auf dem kein Wachstum erfolgen darf.

XXXII. Übung: Haemolyse. a.

Zur Darstellung hämolytischen Serums werden einem Kaninchen 15—20 cem defibriniertes Rinderblut intraperitoneal injiziert.

XXXIII. Übung: Züchten von Typhusbacillen aus Stuhl und Wasser. a.

Herstellung des Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragars nach v. Drigalski-Conradi: 0,75 kg gehacktes Pferdefleisch werden mit 2 l Wasser übergossen und über Nacht stehen gelassen; oder: Herstellung des Fuchsin-sulfitagars nach Endo: a. Herstellen von 1000 cem neutralisiertem 3% Agar mit 1% Pepton und $\frac{1}{2}$ % Kochsalz, b. Übergießen von 10 g Fuchsin mit 100 cem 96% Alkohol, umschütteln, 20 Stunden stehen lassen.

Herstellung von 2 $\frac{1}{2}$ % iger Glycerinbouillon zur Tuberkelbacillen-züchtung; die Reaktion muß so sein, daß rotes Lackmuspapier (Postpapier) gebläut, blaues gerötet wird. 50 cem kommen in ein Erlenmeyerkölbchen.

Für den nächsten Tag ist je eine Schrägagarkultur von Typhus, Coli und Staphylococcen anzulegen.

48. Tag.

VII. Übung: Tuberkulose. e.

Auf den Serunkulturen hat sich, wenn keine Verunreinigung eingetreten ist (vgl. VII. Übung d, 39. Tag) ein feiner matter Belag gebildet. Aus diesem fertigt man mikroskopische Präparate an, die man mit Karbofuchsin färbt und in denen man die Tuberkelbacillen in Reinkultur findet. Doch wird ein derartiger Belag manchmal durch Kristalle vorgetäuscht, die selbst mit der Lupe von jungen Kolonien schwer zu unterscheiden sind. Ferner impft man auf schrägen Glycerinagar über; auch diese Röhrchen müssen mit Paraffin verschlossen werden. Bei

der Impfung der Glycerinbouillon muß das Material auf der Oberfläche schwimmen. Die Serumröhrchen werden weiter aufbewahrt. — Auf den Glycerinagarplatten findet man, wenn sie nicht vermreinigt oder aus-

Fig. 35. Tuberkelbacillen, Plattenkultur aus Sputum. Die Tuberkelbazillenkolonien sind als kleine Häkchen zwischen den viel größeren Streptococcenkolonien zu sehen. 40:1.

Fig. 36. Tuberkelbacillen, Reinkultur. Klatschpräparat. 800:1.

getrocknet sind, bei 60facher Vergrößerung sehr kleine haken- oder S förmige Kolonien (Fig. 35). Man fertigt daraus Klatschpräparate an, die man ebenfalls nach Ziehl färbt (Fig. 36).

XIII. Übung: Herstellen von Typhusserum. e.

Das Serum wird auf seine agglutinierende Kraft gegen Typhus- und Colibacillen geprüft, wie früher beschrieben ist (III. Übung e).

Fickersches Typhusdiagnostikum. Das Diagnostikum erweist sich vor allem sehr wertvoll da, wo nicht sofort eine Typhuskultur zur Verfügung steht. Nötig sind außerdem 0,2 cem blutkörperchenfreies Serum. Man bringt dieses in eines der beigegebenen Spitzgläschen, setzt 0,8 Kochsalzlösung zu, schüttelt gut um, bringt davon 0,5 cem mit 0,5 Kochsalzlösung in ein zweites Spitzgläschen und nun in ein drittes und viertes je 0,1 vom ersten resp. zweiten. Zum dritten und vierten setzt man je 0,9 des Diagnostikums und hat nun im dritten eine Serumverdünnung von 1:50, im vierten von 1:100. Zum Vergleich bringt man in ein fünftes Glas 1 cem des Diagnostikums. Aufbewahren bei Zimmer-temperatur im Dunkeln. Nach 10—12 Stunden tritt Ausfällung von Flöckchen aus der fast klaren Flüssigkeit ein: Präcipitinwirkung. Länger als 20 Stunden darf nicht gewartet werden.

XXIX. Übung: Meningococcen. c.

Auf dem Agar hat sich ein hellgrauer, fast durchsichtiger Belag entwickelt; auf der Gelatine ist wegen der für die Meningococcen zu niedrigen Temperatur kein Wachstum erfolgt. Die Bouillon ist schwach getrübt; auf der Oberfläche beginnt sich ein Häutchen zu bilden. Im mikroskopischen Präparate findet man die Kokken zu zweien oder in Tetraden liegen oder so, daß sich zwei Ketten genau parallel laufen (Tetradenkette). Das weitere Wachstum des Häutchens wird noch einige Tage beobachtet, dann können die Kulturen beseitigt werden.

XXX. Übung: Gonococcen. c.

Die Kolonien auf dem Serumagar haben sich etwas vergrößert; auf dem gewöhnlichen Agar ist kein Wachstum erfolgt. Aufheben von Kulturen für die Sammlung ist zwecklos, da sie doch bald eingehen.

XXXIII. Übung: Züchten von Typhusbacillen aus Stuhl und Wasser. b.

Herstellen des Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragars: Der Anzug aus dem Pferdefleisch wird 1 Stunde gekocht, filtriert, mit 10 g Pepton, 10 g Nutrose, 5 g Kochsalz gekocht, nochmals filtriert, dann 30 g Stangenagar zugesetzt, dieser, wie früher angegeben (VI. Übung b), im Autoklaven oder über der Flamme gelöst mit 10% Sodalösung bis zu schwach alkalischer Reaktion versetzt und nochmals im Dampftopf gekocht. Gleichzeitig kocht man 130 cem Lackmuslösung 1 Minute lang, setzt 15 g Milchzucker zu und kocht noch 15 Minuten. Diese Lösung und den Agar läßt man auf 50° abkühlen, vermischt beides und stellt die vorige Reaktion, falls sie sauer geworden ist (Zersetzung des Milchzuckers durch zu langes Kochen) wieder her. Dazu setzt man 2 cem heißer steriler 10% Sodalösung, ferner 10 cem einer frisch bereiteten 0,1% Lösung von Kristallviolett B der Höchster Farbwerke in heißem Wasser. Der nun fertige Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar wird in sterile Kölbchen zu 100 cem gefüllt und, ohne nochmals zu sterilisieren, aufbewahrt.

Oder Herstellen des Fuchsinulfitagars: zu den 1000 cem des 3% Agar kommen: 5 cem der Fuchsinlösung, 10 g Milchzucker, 25 cem einer frisch hergestellten 10% Natriumsulfitleösung, 10 cem 10% Sodalösung. Der Nährboden zeigt nach dem Erstarren eine ganz leichte Rosafärbung. Er ist dunkel aufzubewahren.

Außerdem füllt man eine Literflasche mit Leitungswasser, damit sich einstweilen die Bakterien darin vermehren und legt eine Bouillonkultur von Typhus an.

XXXIV. Übung: Phagocytose. a.

Einer weißen Maus werden an der Seite die Haare ganz kurz abgeschnitten. Dann werden in die Haut mehrere verschieden tiefe Schnitte von $\frac{1}{2}$ cm Länge in einer Entfernung von $\frac{1}{2}$ cm voneinander gemacht, von denen aber keiner in die Muskulatur einzudringen braucht, und Staphylococcen hinein verrieben.

Ist die mit Milzbrand infizierte Maus eingegangen, so wird die Infektionsstelle herausgeschnitten, soweit das Ödem reicht, in Sublimat fixiert und weiter zu Schnittpräparaten verarbeitet.

49. Tag.

Vakat.

50. Tag.

XXV. Übung: Tetanus. e.

Ist eine der mit tetanusverdächtigen Kolonien geimpften Mäuse unter typischen Erscheinungen eingegangen, so wird die Infektionsstelle

untersucht und daraus Agar- und Gelatineplatten gegossen. Ferner werden die am 45. Tage gegossenen Gelatineplatten untersucht. Die Tetanuscolonien sind 1—2 mm groß; sie haben die Gelatine verflüssigt; bei 60facher Vergrößerung sieht man ein kompakteres Zentrum und von da nach allen Seiten Fäden ausstrahlend. Sie werden wie die Agarcolonien weiter untersucht.

XXVII. Übung: Bac. botulinus. b.

Das Aussehen der Botulinuscolonien auf der Agarplatte ist wie das der Tetanuscolonien. Die Colonien auf der Gelatineplatte haben verflüssigt; in der verflüssigten Zone sieht man bei 60facher Vergrößerung zahlreiche grobe Granulationen hermitanzien oder es zeigen sich auch hier radiäre, von einem strahligen Zentrum ausgehende, teilweise miteinander verfilzte Fäden. Im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglaspräparate sieht man große plumpe Stäbchen mit Eigenbewegung, vielfach mit einer endständigen Spore. Im Zuckeragar- und im Zuckergelatinestich ist starke Gasbildung erfolgt; das Wachstum ist wie das der anderen Anaëroben. Die Bouillon ist getrübt mit starkem Bodensatz; auch hier sind Gasbläschen sichtbar. Der Geruch ist wie bei den anderen Anaëroben. Von der Bouillon injiziert man eine sehr geringe Menge (Bruchteile eines mg genügen) einer Maus in einen Oberschenkel. Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 Stunden ist die betreffende Extremität gelähmt; die Lähmung schreitet rasch auf das andere Bein fort, so daß beide Hinterbeine bei Fluchtversuchen nachgeschleift werden. Dann wird die Muskulatur der Vorderbeine und des Nackens von der Lähmung ergriffen und nach einigen weiteren Stunden tritt der Tod ein. — Auch Meeresschweinchen, Kaninchen, Katzen, Tauben etc. sind zu Versuchen sehr geeignet; bei ihnen fällt außer der Lähmung noch die Pupillenerweiterung auf.

XXXIII. Übung: Züchten von Typhusbacillen aus Stuhl und Wasser. c.

Falls kein Stuhl eines Typhuskranken zur Verfügung steht, verreibt man normalen Stuhl mit Wasser, bis er breiige Konsistenz hat, und vermischt mit etwa 10 ccm davon 1 Öse Typhusbouillon, die man vorher mit 2 ccm Wasser vermischt. Dann gießt man den Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar, resp. den Fuchsin-sulfitar in 4 große Platten etwa 2 mm hoch aus, läßt sie $\frac{1}{2}$ Stunde lang offen stehen, damit sich kein Kondenswasser ansammelt und verreibt mit einem oben rechtwinklig oder dreieckig (Fig. 1) gebogenen Glasstab etwas Stuhl auf der Oberfläche erst der ersten, dann der zweiten etc. Platte, ohne dazwischen abzuglühen. Die Platten kommen mit dem Deckel nach unten in den Brutschrank.

Der Nachweis der Typhusbacillen im Wasser geschieht durch Ausfällung. Man bringt in die Flasche mit 1 l Leitungswasser, das 48 Stunden lang gestanden hat eine Öse Typhusbacillen und schüttelt gut um (Vorsicht vor Infektion!). Dazu setzt man 3,3 ccm Eisenoxycycloridlösung, wodurch ein brauner Niederschlag entsteht. Man läßt diesen sich absetzen, filtriert und verreibt den Filtrerrückstand ebenfalls auf drei große Platten mit Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar, resp. Fuchsin-sulfitar und auf einige Gelatineplatten. Filtrat, Filter, Trichter und Flasche sind zu desinfizieren.

Ferner legt man je eine Schrägagarkultur von Dysenterie, Paratyphus A und Paratyphus B an.

51. Tag.

XXXIV. Übung: Züchten von Typhusbacillen aus Stuhl und Wasser. d.

Auf den Lakmus-Nutrose-Milchzuckeragarplatten haben sich zahlreiche Kolonien entwickelt, die aber leicht voneinander zu unterscheiden sind. Die Colibacillen greifen aus dem Nährboden besonders den Milchzucker an, bilden daraus Säure und rufen dadurch rote Färbung hervor. Die Typhusbacillen zersetzen die Nutrose, und bilden alkalische Produkte, wodurch eine blaue Färbung entsteht. Die gleichfalls blau wachsenden Streptococcen werden durch das Kristallviolett zurückgehalten; von anderen blau wachsenden Bakterien unterscheiden sich die Kolonien der Typhusbacillen durch die tautropfenähnliche durchsichtige Beschaffenheit; auch besitzen sie niemals doppelte Kontur oder ins Bräunliche spielende Färbung. Man erkennt sie am besten, wenn man die Platten gegen das Fenster hält und die Schmalseite der Hand dahinter langsam hin- und herbewegt. Ihre Größe beträgt 1—3 mm. Doch genügen diese Eigenschaften noch nicht zur Unterscheidung, weshalb man noch die Agglutination heranzieht. Man vermischt das kürzlich hergestellte Serum mit physiologischer Kochsalzlösung bis zu der Verdünnung, in der es bei der neulich vorgenommenen Prüfung Typhusbacillen gut agglutiniert hat. Davon bringt man eine Öse auf ein Deckglas, bringt mit einer feinen Nadel eine Spur der verdächtigen Kolonie hinein, verreibt und untersucht bei 60facher Vergrößerung, ob Agglutination eintritt. Ist dies der Fall, so impft man den Rest der Kolonie auf schrägen Agar, um am nächsten Tage weiter zu untersuchen.

In gleicher Weise sind die aus dem Wasser angelegten Platten zu untersuchen. Hier kommt allerdings die Schwierigkeit dazu, daß die Kolonien sehr vieler anderer Wasserbakterien fast genau wie Typhuskolonien aussehen. Gelingt die Isolierung aus diesem Grunde nicht, so läßt man die Platten noch einige Tage bei Zimmertemperatur stehen; dann färben sich die ersteren braun, grün etc., während die Typhuskolonien ihre blaue Farbe beibehalten. Mit den auf den Gelatineplatten gewachsenen typhusverdächtigen Kolonien darf der Agglutinationsversuch nicht gleich angestellt werden, sondern sie müssen zunächst auf Agar übergeimpft und in den Brutschrank gestellt werden, da bei 22° gewachsene Bakterien oft nicht agglutiniert werden.

Auf dem Fuchsinulfagar ist das Wachstum ein analoges. Durch die gebildete Säure haben die Colibacillen die lockere Verbindung zwischen Fuchsin und Sulfat getrennt und sind nun intensiv rot gefärbt mit glänzender, oft gebirgsartiger Oberfläche und einem grünlichen Schimmer, den trockenes Fuchsin hat. Ihr Durchmesser beträgt oft $\frac{1}{2}$ cm und darüber. Die Typhuskolonien sind farblos oder nur ganz leicht rosa, glänzend und nicht mehr als 2 mm groß. Andere Bakterien wachsen nur spärlich darauf.

XXXV. Übung: Dysenterie, Paratyphus. a.

In den Dysenterie- und Paratyphuskulturen findet man bei starker Vergrößerung Stäbchen von der Größe und Gestalt von Typhusbacillen,

die Dysenteriebacillen ohne, die Paratyphusbacillen mit Eigenbewegung. Von allen dreien werden folgende Kulturen angelegt: Gelatineplatten, Agarplatten, Gelatinestich, Agarstich, Schüttelkultur in Zuckeragar, dgl. mit Neutralrot, Bouillon, Milch, Kartoffel, Lackmusmolke, Ausstreichen auf Platten mit Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar.

52. Tag.

XXV. Übung: Tetanus. f.

Sind auf den Zuckeragarplatten wieder charakteristische Kolonien gewachsen, so werden sie mikroskopisch untersucht und dann Zucker-gelatinestich, Zuckeragarstich in hoher Schicht und anaërobe Zuckerbouillonkultur angelegt.

XXVIII. Übung: Bac. enteritidis. b.

Die mit den Fleischvergiftungsbacillen gefütterten Mäuse pflegen nach 5—8 Tagen einzugehen. Bei der Obduktion findet man die oberen Darmpartien mit Flüssigkeit gefüllt, die Peyerschen Plaques sehr stark geschwollen, in Leber und Milz nekrotische Herde. Die inneren Organe einschließlich Darm werden herausgenommen und mikroskopisch untersucht. Man findet darin zahlreiche Stäbchen mit lebhafter Eigenbewegung von Größe, Gestalt und Färbbarkeit des Typhusbacillus. In den inneren Organen sind sie in Reinkultur, im Darm sind außer ihnen noch andere Bakterien (und zahlreiche abgestoßene Epithelzellen) zu sehen. Zur kulturellen Untersuchung gießt man aus der Leber und dem Darminhalt Agar- und Gelatineplatten und streicht auf Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragarplatten (resp. Fuchsinulfagar) mit der Öse von beiden aus. Einige Stückchen Darm mit Plaques und einige nekrotische Herde werden in Formalin fixiert, um zu Schnittpräparaten verarbeitet zu werden. Man findet besonders am Rande der Nekrosen die Bacillen, manchmal in kleinen Häufchen.

XXXIII. Übung: Züchten von Typhusbacillen aus Stuhl und Wasser. e.

Die auf schrägen Agar abgeimpften Kolonien werden in der früher geübten Weise weiter auf ihre Identität mit Typhusbacillen untersucht.

XXXV. Übung: Dysenterie, Paratyphus. b.

Die biologischen Eigenschaften der Dysenteriebacillen sind fast die gleichen wie die der Typhusbacillen. Das Aussehen der Gelatine-, Agar-, Bouillon- und Kartoffelkulturen ist identisch, Traubenzucker wird nicht vergoren, Milch nicht koaguliert, Neutralrot nicht reduziert, Lackmusmolke leicht gerötet, aber nicht getrübt. Auf dem Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar sind die Kolonien klein, blau doch etwas weniger durchsichtig als Typhuskolonien.

Auch der Paratyphusbacillus A wächst auf Gelatine, Agar, Kartoffeln, Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar, in Bouillon, Milch und Lackmusmolke wie der Typhusbacillus; dagegen vergärt er Traubenzucker und zersetzt Neutralrot.

Der häufigere *Paratyphusbacillus B* steht dem *B. coli* kulturell näher: sein Wachstum auf Gelatine, Agar und Kartoffeln ist üppig, die Lackmuspilze hellrot gefärbt und getrübt, Traubenzucker vergoren, Neutralrot zersetzt, die Milch dagegen nicht koaguliert. Die Kolonien auf Lackmus - Nutrose - Milchezuckeragar sind blau, doch etwas größer und undurchsichtiger als die des *Typhusbacillus*.

Die Kulturen werden zur weiteren Beobachtung aufbewahrt.

53. Tag.

XXV. Übung: Tetanus. g.

In den Zuckergelatinestichkulturen ist das Wachstum noch sehr gering: üppiger in den Zuckeragarstichkulturen, von deren Stichkanal zahlreiche Fäden ausgehen. Auch Gas wird gebildet. — Die Bouillonkultur ist getrübt und zeigt ebenfalls kleine Gasbläschen.

XXVIII. Übung: *Bac. enteritidis. c.*

Auf den aus den Organen gegossenen Gelatineplatten sind zahlreiche Kolonien gewachsen, die sich von denen des *Bact. coli* kaum differenzieren lassen. Auf den Lackmus-Nutrose-Milchezuckeragarplatten sind blaue Kolonien zu sehen, die sich von denen der *Typhusbacillen* durch ihre bedeutendere Größe und ihre geringere Durchsichtigkeit unterscheiden. — Auf den aus dem Darm gegossenen Gelatineplatten sind die *B. enteritidis*-Kolonien von denen mancher anderen Darmbakterien nicht zu unterscheiden; dagegen ist ihre Unterscheidung leicht auf den Lackmus-Nutrose-Milchezuckeragarplatten, wo sie sich durch ihre blaue Färbung vor den rotwachsenden *Coli* auszeichnen. — Bei der Untersuchung mit starker Vergrößerung findet man lebhaft bewegliche Stäbchen vom Aussehen des *Typhusbacillus*. Von den aus den Organen gewonnenen Kolonien werden folgende Kulturen angelegt: Gelatinestich, Agarstich, Agarstrich, Bouillon, Milch, Zuckeragar mit Neutralrot.

XXXI. Übung: Rotz. b.

Bei den mit Rotzbacillen intraperitoneal geimpften Meerschweinchen tritt nach 2—4 Tagen von außen fühlbare Hodenschwellung ein; wenige Tage später geht das Tier zugrunde. Die Obduktion hat mit großer Vorsicht zu geschehen. Man findet einen mehr oder minder starken eitrigen Belag am Peritoneum, besonders in der Gegend der Hoden, deren Tunica vaginalis geschwollen ist. In allen Organen sind kleine Knötchen, teils einzeln, teils konfluierend und von verschiedener Größe, zu sehen. Die Milz ist vergrößert. Ausstrichpräparate werden von dem Peritoneum und von einem Knötchen angefertigt und mit verdünntem Karbolfuchsin gefärbt. Man sieht feine Stäbchen von verschiedener Länge: teils ganz kurz, teils so lang wie *Diphtheriebacillen*, mit denen sie auch die kolbige Anschwellung und die septierte Färbung gemeinsam haben; doch sind sie schlanker. Viele liegen in Leukocyten (Fig. 37). Aus einem der Knötchen werden mit nicht zu wenig Material Glycerinagarplatten gegossen, der Rest der Organe zu Schnittpräparaten mit Sublimat fixiert.

Der Käfig, in dem das Tier gegessen hatte, ist sorgfältig zu desinfizieren.

XXXV. Übung: Dysenterie, Paratyphus. c.

Die Kulturen haben sich weiter entwickelt; die Oberflächenkulturen der Dysenteriebacillen auf Gelatine zeigen feine Linien und Sprünge wie Typhuskolonien, die der Paratyphusbacillen von Typus A und besonders vom Typus B lassen sie vermissen.

54. Tag.

XXVIII. Übung: Bac. enteritidis. d.

Die Kolonien auf den Platten haben sich vergrößert; das Wachstum auf Agar und Gelatine und in Bouillon ist wie das des *B. coli*; der Zucker ist vergoren, das Neutrahit zersetzt, die Milch nicht koaguliert. Die Milchkultur wird noch aufbewahrt, die anderen Kulturen können beseitigt werden.

XXXI. Übung: Rotz. c.

Auf den Glycerinagarplatten sind zahlreiche graugelbliche Kolonien gewachsen, die den Agarkolonien von *B. coli* äußerst ähnlich sehen. Bei starker Vergrößerung sieht man kleine, unbewegliche Bacillen (Fig. 38),

Fig. 37. Rotzbacillen im Ausstrich aus peritonealem Eiter eines Meerschweinchens. 800 : 1

Fig. 38. Rotzbacillen. Ausstrich aus Agarkultur. 800 : 1.

die nicht ganz regelmäßig gestaltet sind, sondern dickere und dünnere Stellen zeigen und auch ungleich lang sind, ähnlich wie die Diphtheriebacillen. Färbung nach Gram ist negativ. Man legt folgende Kulturen an: Agarstich, Agarstrich, Bouillon, Gelatinestich, Kartoffel; die beiden letzteren werden bei 23° aufbewahrt.

XXXV. Übung: Dysenterie, Paratyphus. d.

Die Bouillonkulturen von Dysenterie und Paratyphus werden auf Indolbildung untersucht; die Reaktion fällt negativ aus. Die Kulturen werden nach nochmaliger Betrachtung beseitigt, außer den Milch- und den Lackmusmolkekulturen.

XXXVI. Übung: Bactericide Wirkung des Blutserums. a.

Ein Kaninchen wird in der früher geübten Weise entblutet und das Blut zur Gewinnung von Serum über Nacht kühl aufbewahrt.

Ferner wird eine Schrägagarkultur von Typhusbacillen und eine Kultur auf Löfflerschem Serum von Pneumococcen angelegt.

55. Tag.

XXV. Übung: Tetanus. h.

In den Zuckeragarstichkulturen ist der Stichkanal von Ausläufern besetzt und von einer wolkigen Trübung umgeben; auch Gas ist gebildet. Ebenso zeigen die Gelatinestichkulturen zahlreiche Härchen um den Stichkanal und Gasbildung. Das Wachstum beginnt bei beiden erst etwa 1 cm unter der Oberfläche.

XXVIII. Übung: Bac. enteritidis. e.

Die Indolreaktion in der Bouillonkultur fällt manchmal positiv, manchmal negativ aus. Die Kulturen können beseitigt werden außer der Milchkultur.

XXX. Übung: Rotz. d.

Das Wachstum auf Agar und in Bouillon bietet nichts Charakteristisches. Auf der Gelatine und der Kartoffel ist es noch sehr schwach.

XXXVI. Übung: Bactericide Wirkung des Blutserums. b.

Frisches Blutserum der meisten Tiere hat deutliche bacterientötende Eigenschaften. Bringt man Bakterien aus einer Reinkultur hinein und gießt sofort und einige Zeit später Platten, so kann man deutliche Abnahme und, wenn die Einsaat nicht zu groß war, vollständiges Verschwinden konstatieren. Doch hat das Serum diese Eigenschaft mit vielen Flüssigkeiten gemeinsam: beim Wechsel des Nährmediums geht nämlich stets ein großer Teil der Bakterien zugrunde. Charakteristisch für das Serum ist aber, daß die bactericide Wirkung durch halbstündiges Erwärmen auf 55° aufgehoben wird. Man bringt also in 2 sterile Reagenzgläser je 5 cem Serum und erwärmt das eine im Wasserbad eine halbe Stunde lang auf 55°. Dann bringt man nach dem Abkühlen in beide ganz wenig Typhusreinkultur (die Spitze einer Nadel) verreibt gut und gießt je eine Agarplatte mit einer Öse sofort, ebenso nach 2, 6 und 24 Stunden. In der Zwischenzeit ist das Serum im Brutschrank aufzubewahren.

Ferner ist die Pneumococcenkultur mit wenig physiol. Kochsalzlösung aufzuschwemmen und davon ein Tropfen einem Kaninchen unter die behaarte Haut des Ohres zu injizieren.

Dem mit Vibrionen immunisierten Kaninchen sind, wenn es sein früheres Gewicht wieder erreicht hat, einige cem Blut aus einer Ohrvene steril zu entnehmen und zur Gewinnung von Serum kühl aufzubewahren.

Ferner sind aus den eingebetteten Infektionsstellen der mit Milzbrand resp. Staphylococcen infizierten Mäuse (48. Tag) Schnittpräparate

anzufertigen, und zwar ist das Milzbrandpräparat längs, das Staphylococcenpräparat quer zur Richtung der infizierenden Wunde zu schneiden. Um einen Überblick über die ganze Infektionsstelle zu bekommen, nimmt man etwa jeden zehnten erhaltenen Paraffinschnitt zur weiteren Untersuchung und klebt sie zusammen auf ein Deckglas auf.

56. Tag.

Für den nächsten Tag ist eine Schrägagarkultur des zur Immunisierung benutzten *Vibrio* anzulegen.

57. Tag.

XXXI. Übung: Rotz. e.

Die Entwicklung in der Gelatine ist gering; das Wachstum im Stichkanal ist fadenförmig, schwach gekörnt, auf der Oberfläche zart, gran. — Auf der Kartoffel hat sich ein hell braungelber Belag gebildet.

XXI. Übung: Bacteriolyse. d.

Pfeifferscher Versuch. Zunächst zieht man kurze Glasrohre zu Kapillaren von etwa 5 cm Länge aus. Da die Wertigkeit des erhaltenen Serums noch unbekannt ist, ist der Pfeiffersche Versuch mit verschiedenen großen Serummengen anzustellen. Man bringt zunächst 1 Öse (zu 2 mg) des Serums in 1 ccm physiolog. Kochsalzlösung und verreibt 1 Öse der Vibrionenagarkultur hinein. Die ganze Menge wird einem Meerschweinchen intraperitoneal injiziert. Nach 10 Minuten macht man an der Injektionsstelle einen kleinen Schnitt, der die Muskulatur bloßlegt und geht mit einer Kapillare durch diese unter leichtem Drücken und Drehen in die Bauchhöhle ein. Die Kapillare füllt sich besonders beim Herausziehen. Der erhaltene Tropfen wird sofort auf Deckgläser verteilt und untersucht. Ebenso entnimmt man 20, 30 und 60 Minuten nach der Injektion. Außerdem fertigt man ein Kontrollpräparat aus der Kultur im hängenden Tropfen an. Man sieht (Anfertigung von hängenden Tropfen und gefärbten Deckglaspräparaten), wie die zuerst lebhaft beweglichen Vibrionen unbeweglich werden, aufquellen, sich zu Kugeln umwandeln (Fig. 39) und verschwinden oder auch sich in der Flüssigkeit auflösen. Der Prozeß geht im

Fig. 39. Bacteriolyse. *Vibrio*. 800 : 1.

hängenden Tropfen nicht weiter, sondern nur im Tierkörper. Nach spätestens einer Stunde sind alle Vibrionen aus dem Peritoneum verschwunden und das Tier bleibt am Leben. Einem anderen Meerschweinchen injiziert man 1 Öse Vibrionenkultur in 1 ccm physiol. Kochsalzlösung ohne Zusatz von Serum. Hier tritt keine Auflösung ein, sondern die Vibrionen ver-

mehren sich, das Tier stirbt nach einigen Stunden. Sollte auch bei Zusatz von Serum keine Auflösung eingetreten sein, so war dieses zu schwach und der Versuch muß mit einer größeren Menge (0,05 cem) wiederholt werden.

Die Wirkung ist streng spezifisch. Steht noch ein *Vibrio* von einer anderen Art zur Verfügung, so wiederholt man den Versuch mit diesem und findet, daß er auch bei Zugabe von Serum nicht aufgelöst wird.

Das mit *Pneumococcen* infizierte Ohr des Kaninchens ist stark gerötet und geschwollen und fühlt sich heiß an. Man macht einen kleinen Schnitt hinein und untersucht die heraustretende Flüssigkeit im gefärbten Deckglaspräparat (Färbung 1 Stunde mit 30fach verdünntem Karbolfuchsin, sowie nach Gram unter Gegenfärbung mit Bismarckbraun). Auch hier sieht man Auflösung der *Pneumococcen* in allen Stadien. Ein Teil hat normales Aussehen und ist von einer Kapsel umgeben; bei anderen liegen in der Kapsel nur noch zerbröckelte, aber gut färbbare Teile des Mikroorganismus; und schließlich findet man zahlreiche leere Kapseln, die bei der Gramschen Färbung die Gegenfarbe annehmen.

Die von der Infektionsstelle mit Milzbrand angefertigten Schnittpräparate werden nach Gram unter Vorfärbung mit Bismarckbraun gefärbt. Man sieht an der Infektionsstelle selbst und in dem sie umgebenden entzündlichen Ödem teils wohl erhaltene Bacillen (gleichmäßig dunkelviolet gefärbt mit brauner Kapsel), teils degenerierte. Diese sind manchmal gequollen, wurstförmig, manchmal von normaler Gestalt aber schlechter Färbbarkeit, oft ist nur noch die Kapsel erhalten.

Für den nächsten Tag sind dem mit Rinderblut injizierten Kaninchen einige cem Blut zu entnehmen und zur Gewinnung von Serum kühl aufzubewahren; ebenso von einem normalen Kaninchen; ferner ist steriles defibriniertes Rinderblut zu besorgen. Außerdem ist ein Frosch zu beschaffen.

58. Tag.

XXXII. Übung: Haemolyse. b.

Von dem defibrinierten Rinderblut macht man eine 5% Lösung in physiologischer Kochsalzlösung und bringt davon in 12 Reagenzgläser je 0,2 cem. Dazu setzt man 0,2; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001 des Serums des vorbehandelten resp. des nicht vorbehandelten Kaninchens. Bei Zusatz des hämolytischen Serums sieht man Hämolyse, d. h. das Blut wird lackfarben und im hängenden Tropfen findet man keine roten Blutkörperchen mehr. Nur wo die zugesetzte Menge zu gering war, tritt die Erscheinung nicht ein. Degegen fehlt sie nach Zusatz des normalen Serums auch da, wo große Mengen zugesetzt wurden.

Darauf inaktiviert man den Rest des hämolytischen Serums indem man ihn im Wasserbade $\frac{1}{2}$ Stunde auf 55° erhitzt und setzt wieder zu je 2 cem Blutlösung dieselben Mengen Serum wie oben. Nun tritt das Lackfarbenwerden nicht mehr ein. Nachdem man sich davon überzeugt hat, setzt man zu jeder Probe noch 0,01 cem des nicht erhitzten Serums des normalen Kaninchens, das an sich nicht hämolytisch wirkte. Sofort bemerkt man Hämolyse in denselben Konzentrationen wie beim ersten Versuch.

Zur Hämolyse ist also das Zusammenwirken zweier Stoffe nötig: der eine ist schon im normalen Serum vorhanden (Complement), der

andere bildet sich erst bei der Immunisierung (Amboceptor). Im frischen Immenserum sind beide vorhanden; durch halbstündige Erhitzung auf 55° wird das Komplement zerstört, so daß keine Hämolyse mehr auftritt; doch bleibt der Amboceptor erhalten, so daß Zusatz des complementhaltigen an sich nicht hämolytischen, weil amboceptorfreien Normalserums wieder Hämolyse hervorruft.

Dem Frosche wird mit einem Seidenfaden die Zunge an ihrer Basis unterbunden, damit sich der darunter gelegene Lymphsack füllt.

Ferner wird je eine Milzbrand- und Staphylococcenkultur auf schrägem Agar angelegt.

59. Tag.

XXXIV. Übung: Phagocytose. b.

Eine Öse Staphylococcenkultur wird in 1 cm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und davon zwei Mäusen je 0,2 cm intraperitoneal injiziert. Eine Maus wird nach einer halben, die andere nach 2 Stunden getötet und das peritoneale Exsudat im hängenden Tropfen und im gefärbten Deckglasausstrich untersucht. Der Ausstrich muß sehr sorgfältig geschehen, damit die Leucocyten nicht zerrissen werden. — Man sieht zahlreiche Leucocyten, die anfangs nur einen Teil, später alle Coccen in sich aufgenommen haben.

Um die Phagocytose auch unter dem Mikroskop beobachten zu können, entnimmt man aus dem angeschwollenen sublingualen Lymphsack des Frosches mit einer Spritze die Lymphe, die viele Leucocyten enthält. Die Unterbindung kann dann gelöst werden. Dann macht man eine Aufschwemmung von Milzbrandkultur in physiologischer Kochsalzlösung (gut verreiben) und bringt eine Öse davon mit einer Öse Lymphe im hängenden Tropfen zusammen. Man sieht, wie die Leucocyten Milzbrandbacillen in sich aufnehmen; an lange Fäden pflegen sich mehrere Leucocyten zu heften und sie zu umgeben, indem sie sich dabei ganz lang ausziehen.

Die Schnittpräparate von der Haut der mit Staphylococcen infizierten Maus werden nach Gram unter Vorfärbung von Karmin gefärbt. Man sieht, wie die Coccen in das Unterhautzellgewebe eingedrungen und von Leucocyten aufgenommen worden sind, die einen dichten Wall um die Infektionsstelle bilden. Da alle Staphylococcen an der Infektionsstelle phagocytiert und vernichtet werden, ist die Maus gegen sie immun.

60. Tag.

XXXI. Übung: Rotz. f.

Der Belag auf der Kartoffel hat eine dunkelbraune Farbe angenommen.

Die in Paraffin eingebetteten Organe werden geschnitten und gefärbt. Die Färbung bietet etwas größere Schwierigkeiten als die anderer Bakterien, da die Rotzbacillen sehr klein sind und das sie enthaltende Gewebe sehr reich an Chromatin ist. Doch kann man sich die Färbung wesentlich erleichtern, wenn man die Schnitte dünn macht (etwa 5 μ). Vorteilhaft ist es ferner „in Paraffin“ zu färben, da sie dann nicht mit

Alkohol in Berührung kommen, der gerade den Bacillen den Farbstoff leicht entzieht. Man legt also etwa 6 Schnitte, ohne sie in Xylol zu entparaffinieren, in 10fach verdünntes Karbolfuchsin, nimmt alle halbe Stunde einen heraus, läßt ihn gründlich trocken werden, entparaffiniert ihn in Xylol und bringt ihn in Kanadabalsam. Auch aufgeklebte Schnitte lassen sich so gut färben. Auch folgende Färbung ist sehr zu empfehlen: 1. Entparaffinieren in Xylol; abs. Alkohol etc.; Wasser. 2. Färbung über Nacht in folgender Lösung: Orcein D (Grübler) 0,1; officin. (= 25%) Salpetersäure 2,0; 70% Alkohol 100,0. 3. Kurzes Abspülen in 70% Alkohol. 4. Wasser. 5. Färben in Unna's polychromem Methylenblau (Grübler) 1–2 Stunden. 6. Dest. Wasser. 7. Differenzieren in „Glyzerinäthergemisch“ 1:2 Wasser, bis die Schnitte hellblau erscheinen. 8. Gründliches Auswaschen in dest. Wasser. 9. 70% Alkohol, abs. Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Diese Methode gibt auch bei der Färbung anderer Bakterien vorzügliche Resultate; die Vorbeizung in Orcein kann hier weggelassen werden.

In den Rotzschnitten sieht man Knötchen, die aus Leukozyten und zum kleineren Teil aus epitheloiden Zellen bestehen; ein Teil der Zellen ist zugrunde gegangen, die Reste der Kerne nehmen den Farbstoff noch intensiv an. Dazwischen sieht man die sehr kleinen Bacillen, teils einzeln, teils in Häufchen liegen.

Weiter ist noch folgendes zu beobachten:

Auf der Serumkultur der Tuberkelbacillen ist der Belag etwas dichter geworden. Auf dem Glyzerinagarröhrchen sind kleine Schüppchen gewachsen, die in den nächsten Wochen an Größe zunehmen, bis die ganze Kultur einen „gebirgsartigen“ Eindruck macht. Auf der Glyzerinbouillon hat sich ein ziemlich dickes Häutchen gebildet.

In der Zuckergelatinekultur der Tetanusbacillen haben sich die Ausläufer vergrößert; außerdem ist Verflüssigung eingetreten. Die Milchkultur des Bac. enteritidis beginnt sich nach etwa 10 Tagen aufzuhellen, ebenso die des Paratyphus B, während die von Paratyphus A und Dysenterie unverändert bleibt. Die Lackmusmolke von Paratyphus B wird nach derselben Zeit stark alkalisch (blau).

XXXVII. Übung: Diphtheriegift und -Antitoxin.

1. In der IX. Übung wurde nur eine ungefähre Virulenzbestimmung der Kultur vorgenommen; zur Herstellung von Diphtheriegift verfährt man in folgender Weise: Von einer Bouillon, die in gewöhnlicher Weise, aber mit 2% Pepton hergestellt wird und rotes Lackmuspapier bläut, blaues nicht rötet, kommen in 4 Erlenmeyerkölbchen zu 100 cem je 20 cem. Die Beimpfung mit Diphtheriekultur geschieht nur ganz oberflächlich, damit sich ein Häutchen bildet. Dadurch wird erreicht, daß die Bazillen sehr viel Sauerstoff zur Verfügung haben und somit sehr viel Gift bilden. Am besten ist es, wenn die Bouillon unter dem Häutchen überhaupt nicht getrübt wird. Die Kölbchen bleiben 14 Tage im Brutschrank stehen. Nach dieser Zeit wird ihr Inhalt zusammengeworfen und die Bazillen entweder abgetötet oder abfiltriert. Die Abtötung geschieht durch Übersichten mit Toluol; von diesem Desinfektionsmittel löst sich gerade so viel, daß nach etwa 3 Tagen die Flüssigkeit keimfrei ist, ohne daß eine Schädigung des Giftes eintritt; außerdem verhindert es die Verdunstung. — Zieht man vor, zu filtrieren (bei

sporenhaltigen Bakterien, wie Tetanus, ist dies unbedingt nötig), so sterilisiert man die Tonkerze (Chamberlandfilter) in dem Gefäß, in das filtriert werden soll, im Dampftopf, verbindet das offene Ende des Gefäßes mit einer Wasserstrahlluftpumpe, filtriert die Kultur durch ein Papierfilter (um Klümpchen zu entfernen) in die Tonkerze und dann unter Druck durch diese. Das Filtrat bringt man in ein steriles Gefäß und überschichtet es, wenn man es aufbewahren will, ebenfalls mit Toluol.

2. Prüfung der Giftigkeit. Von dem Filtrat injiziert man Meerschweinchen von 250—300 g Gewicht 0,5; 0,05; 0,005; 0,0005 ccm (Verdünnung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung). Wie früher erfolgt teils schnell der Tod, teils Nekrosenbildung an der Injektionsstelle, teils fehlt auch diese. Von Wichtigkeit ist hier nur die tödliche Dosis und zwar die, die nach spätestens 5 Tagen zu töten imstande ist. Ist z. B. nach dieser Zeit das mit 0,05 ccm injizierte Meerschweinchen eingegangen, das mit 0,005 injizierte noch am Leben, so wird zwischen diesen beiden Dosen weiter untersucht. — Ein Gift, von dem 0,01 ccm eben genügt, heißt Normalgift (D T N¹), genügt 0,001 ccm eben, so heißt es 10fach Normal (D T M¹⁰) etc.

3. Zum Studium der Antitoxinwirkung verwendet man aus der Apotheke bezogenes Heilserum. Ein Serum, von dem 0,1 ccm die Wirkung von 1 ccm Normalgift am Meerschweinchen aufhebt, heißt Normalserum (D A N¹): 1 ccm dieses Serums enthält eine Immunisierungseinheit. Genügt schon 0,001 ccm, so heißt das Serum 100fach Normal (D A N¹⁰⁰) etc. Man mischt nun im Reagenzglas die eben tödliche Menge des Giftes mit der Serummenge, die nach dieser Berechnung zu ihrer Neutralisation genügt, füllt zu 4 ccm auf und injiziert die Menge einem Meerschweinchen von 250—300 g. Das Tier bleibt gesund. — Vier anderen Tieren wird dieselbe Giftdosis injiziert, dieselbe Antitoxinmenge aber erst 1, 2, 3 resp. 4 Tage später. Die Tiere erliegen der Infektion oder bekommen wenigstens Nekrosen. Der Versuch kann noch in der Weise modifiziert werden, daß bei Versuchen, die Giftwirkung erst am Tage nach der Injektion aufzuheben, verschieden große Antitoxindosen injiziert werden (bis zum 10fachen); zur glatten Heilung sind dann viel größere Mengen nötig als bei sofortiger Antitoxininjektion. Daraus folgt, daß bei Krankheitsfällen stets eine möglichst frühzeitige Injektion und, da wir die Menge des zirkulierenden Giftes nicht kennen, eine hohe Antitoxindosis indiziert ist.

XXXVIII. Übung: Untersuchung von Tonsillen, Conjunctiva, Rachen, Harn, Fäces, Smegma etc.

Wer selbständig arbeiten will, muß unbedingt die häufigeren Bakterienarten kennen lernen, die ihm vorkommen können. Nachdem die Luftkeime bereits früher studiert worden sind, ist es jetzt vor allem wichtig, die Bakterien des vom Menschen stammenden Materials zu untersuchen.

Tonsillen, Conjunctiva, Rachen. Man entnimmt von sich und anderen Personen mit einem Tupfer (s. IX. Übung) Abstriche von Tonsillen, Conjunctiva und Rachen, fertigt daraus Ausstrichpräparate an und streicht auf Agarplatten, Löfflersches Serum und blutbestrichenen Agar aus. Auf den Tonsillen findet man besonders Staphylococcen, Streptococcen und kurze Stäbchen, auf der Conjunctiva Pneumococcen und Stäbchen, die morphologisch mit den Diphtheriebacillen Ähnlichkeit haben

(Pseudodiphtheriebacillen) und in derselben Weise wie diese (Übung IX) zu untersuchen sind (meist bedeutend zarteres Wachstum, Fehlen der Körnchen, der Säurebildung und der Pathogenität).

Ferner untersucht man Smegma mikroskopisch und kulturell; bei Färbung nach der Tuberkelbacillenmethode wird man, wenn man nur kurz entfärbt, öfters Stäbchen finden, die den Farbstoff behalten, aber meist etwas dicker als Tuberkelbacillen, sehr schwer züchtbar und nicht pathogen sind (Smegmabacillen, Psendotuberkelbacillen).

Zu den Materialien, die öfter zur Untersuchung kommen, gehört der Urin. Oft wird man ihm nicht frisch erhalten. Um die Bakterien kennen lernen, die in einem solchen Falle besonders lästige Verunreinigungen sind, läßt man mehrmals Urin in einer Petrischale kürzere oder längere Zeit offen stehen und untersucht mikroskopisch und kulturell.

In derselben Weise werden die Bakterien des Stuhles aërob und anaërob untersucht.

XXXIX. Übung: Züchten von Tuberkelbacillen aus Sputum.

Die Züchtung der Tuberkelbacillen gelingt leicht mittels Tierpassage (VII. Übung), schwerer direkt aus tuberkulösem Sputum; doch sollte sie jeder Praktikant ausgeführt haben. Bei der Auswahl eines geeigneten Sputums kommt es weniger auf eine große Zahl von Tuberkelbacillen, als auf eine geringe Zahl von Begleitbakterien an. Da auch dann die Tuberkelbacillen auf Serum oder Glycerinagar überwuchert werden, stellt man sich folgenden Nährboden her: 10 g Staugenagar, 5 g Kochsalz, 1,43 g Kristallsoda, 100 Wasser. Auf diesem Nährboden wachsen die Tuberkelbazillen nur auf Kosten des mitangestrichenen Schleimes, andere Bakterien bleiben relativ zurück. Er wird in Petrischalen ausgegossen, dann ein Sputumballen in mehreren Gefäßen mit sterilem Wasser abgespült, zerzupft und auf eine Anzahl Platten ausgestrichen. Aufbewahrung in feuchter Kammer wie früher (VII. Übung). Nach 10 Tagen sind die Tuberkelbacillenkolonien zwischen den bedeutend größeren Streptococcen etc. Kolonien als kleine Häkchen und S-Formen sichtbar (Fig. 35); sie werden auf bei 70° erstarrtes Serum abgeimpft, mit Paraffin zugeschmolzen und im Brutschrank weitergezüchtet.

XL. Übung: Pathogene Schimmelpilze.

Erkrankungen durch Schimmelpilze (fast stets *Aspergillus fumigatus*) kommen beim Menschen auf der Cornea und in den Atmungsorganen vor; bei Versuchstieren kann man außer diesen durch intravenöse Injektion interessante Krankheitsprozesse hervorrufen.

Das Einfangen des *Asp. fumigatus* geschieht sehr leicht auf Brot. Man bringt in 6 Petrischalen einige mm hoch Schwarzbrotkrumen, feuchtet stark an, sterilisiert im Dampftopf und läßt 3 davon verschieden lange Zeit (bis zu einigen Stunden) offen stehen. Dann Aufbewahrung im Brutschrank. Nach 1—2 Tagen sind die Schimmelpilze deutlich zu unterscheiden. *Asp. fumigatus* (über das Aussehen der Aspergillen siehe Übung XVI) bildet einen erst olivengrünen, dann braungrünen Rasen; die Fruchträger sind unverzweigt, ebenso die an ihren Enden sitzenden kleinen, die Sporen abströmenden Sterigmen. Die Sporen (Conidien) sind kugelig, olivbraun und haben 2,5—3 μ im Durchmesser. Außerdem kann man noch finden: *Asp. flavus* s. *flavescens*: Rasen gelblich-

grün, Sporen 5–7 μ im Durchmesser, weniger pathogen, daher für bestimmte Versuchszwecke (intraven. Injektion) besser zu gebrauchen. *Asp. niger* und *Asp. nidulans*, Sterigmen bei beiden verzweigt; Rasen bei ersterem dunkelbraun bis schwarz, bei letzterem grün.

Die gesuchte Art wird auf die 3 übrigen Platten mit Brot übergeimpft und so lange im Brutschrank gelassen, bis diese dicht überwuchert sind. Ferner werden 2 Agarröhrchen angesäuert, so daß der Agar blaues Lackmuspapier rötet, rötes nicht mehr bläut (nicht zu stark ansäuern, da er sonst nicht mehr erstarrt); dann schräg gelegt und beimpft.

1. Zur Erzeugung einer *Keratomykosis aspergillina* bringt man einen Tropfen steriler phys. Kochsalzlösung in ein Agarröhrchen, verreibt die Sporen darin und schwemmt dann mit 1 cem Kochsalzlösung ab. Damit infiziert man ein Kaninchen beiderseits auf die Cornea, indem man nach Kokainisierung die Spitze der Kanüle etwa 2 mm tief tangential einführt und durch leichten Druck injiziert. Dabei muß ein Quellungshof von etwa 2 mm Durchmesser entstehen. Im Verlauf der nächsten Tage sieht man eine Trübung: der Stichkanal ist durch die injizierten Sporen braun gefärbt, von ihm sieht man, besonders bei Lupenbetrachtung, feinste Ausläufer ausgehen. Die Trübung nimmt in den nächsten Tagen zu; gleichzeitig tritt zwischen ihr und dem Hornhautrand ein sichel- oder ringförmiger Streifen auf, der an Breite und Ausdehnung zunimmt, bis er sich in wenigen Tagen zu einem geschlossenen Ring eitriger Infiltration ausgebildet hat. Nur bei geringer Virulenz bildet sich die Infiltration in der allernächsten Nähe des Stichkanals. Ferner entsteht ein Hypopyon. Das Tier wird etwa am 4. Tage getötet, die Augen in Sublimat fixiert, nach Härtung in Alkohol die Hornhaut herausgeschnitten und in Paraffin eingebettet. Das Schneiden (Schnittstärke 15–20 μ) geschieht bei einer parallel, bei der anderen senkrecht zur Oberfläche. Gefärbt wird mit Hämatoxylin-Eosin (Hämatoxylin Delafield 5–10 Minuten; Auswaschen in Wasser; kurzes Differenzieren in 1% Salzsäure-Alkohol; gründliches Auswaschen in Leitungswasser, dem, wenn es zu weich ist (unter 5 Härtegrade) einige Tropfen einer konz. Lösung von Lithion carbonicum zugesetzt werden; Eosinlösung (1 promille in 96% Alkohol) $\frac{1}{2}$ –1 Min.; längeres Auswaschen in 96% Alkohol; abs. Alkohol; Xylol; Kanadabalsam) — oder mit der Weigertschen Modifikation der Gramschen Färbung (s. S. 48).

Man sieht: Von dem Stichkanal breiten sich die Pilzfäden nach allen Richtungen, auch nach unten und oben unter reichlicher Verästelung aus. In einiger Entfernung von ihnen liegt der Infiltrationsring, der aus dichtgedrängten, an der Seite gegen die Schimmelpilze zu zerfallenen Leucocyten besteht und sich unten weiter nach der Mitte des Herdes hin erstreckt als oben. Die Pilzfäden wachsen sehr selten in den Leukozytenring hinein, niemals darüber hinaus; meist befindet sich eine freie Zone zwischen beiden. Nur bei sehr langsamem Wachstum der Pilze sind die einzelnen Fäden mit Eiterkörperchen umgeben.

2. Die Erzeugung einer *Pneumomykosis aspergillina* gelingt mit Sicherheit nur an Tauben, am bequemsten durch Inhalation. Man setzt eine Taube 2 Stunden lang unter eine Glasglocke oder in eine Kiste und stellt die drei Petrischalen mit Reinkultur auf Brot dazu; durch den Flügelschlag wird oft genügend Material verstäubt, andernfalls muß man durch Blasen mittels eines Glasrohres nachhelfen. Am nächsten Tage erscheint die Taube krank, am zweiten oder dritten stirbt sie.

Man findet die Lungen teilweise hepatisiert und mit grauen oder gelben Herden durchsetzt. Mikroskopisch untersucht man sofort im Zupfpräparate, indem man etwas 3% Kalilauge zusetzt. Die Schimmelpilzfäden und die nicht ausgekeimten Sporen treten dann deutlich hervor. Fixieren in Formol oder Sublimat. Färben der Schnittpräparate wie vorher. Das Parenchym der Lunge ist an den gelb gefärbten Partien nekrotisch; zwischen stark zerfallenen Leucoeytenkernen liegt ein dichtes Mycel von Aspergillusfäden, die noch weiter in die Umgebung eindringen. Manchmal findet man auch die ganzen Schimmelvegetationen in Riesenzellen liegen, die ganz kolossale Dimensionen annehmen können.

3. Der Befund nach intravenöser Injektion ist verschieden, je nachdem man viel oder wenig Sporen nimmt. Man macht sich eine dichte Aufschwemmung in Kochsalzlösung: einen Teil davon verdünnt man, bis mit bloßem Auge kaum noch eine Spur von Trübung zu erkennen ist. Arbeitet man mit *Asp. flavus*, so injiziert man von diesem $\frac{1}{2}$ cem in die Ohrvene; von *Asp. fumigatus* verdünnt man erst nochmals 5—10fach und injiziert ebensoviel. Einem anderen Kaninchen injiziert man $\frac{1}{2}$ cem der dichten Aufschwemmung ebenfalls intravenös. Dieses Kaninchen pflegt vor Ablauf 24 von Stunden einzugehen. Man findet mikroskopisch (ungefärbt, ohne und mit Zusatz von Kalilauge) eine Verschimmelung des ganzen Tieres: die sämtlichen Blutgefäße sind von dem Mycel durchwachsen. Schnittpräparate geben gleichfalls gute Bilder. Das andere Kaninchen wird nach 24 Stunden getötet. Man findet, besonders in Lunge und Niere, mehr oder weniger zahlreiche kleine graue Knötchen, die wieder im Zupfpräparate und im Schnittpräparate untersucht werden. Man sieht, besonders in letzterem, die Pilzfäden nach allen Seiten von einem Punkte aus strahlenförmig aneinandergehen. Die zentralen Partien des Rasens sind von einem Leukozytenmantel umgeben, während peripher längere Fäden in die Umgebung verlaufen und hier ohne zellige Infiltration das Gewebe nach allen Seiten durchsetzen. In der Lunge findet das Auskeimen teils in den Gefäßen, teils in den Alveolen statt. Infiziert man mehrere Tiere und tötet sie nach verschieden langer Zeit, so kann man den Verlauf des Prozesses in Schnittpräparaten sehr schön verfolgen.

XLI. Übung: Bestimmung des Colititers.

Das typische *Bact. coli* findet sich in größerer Menge überall, wohin menschliche Abgänge gelangt sind; aus seiner Menge kann auf derartige Verunreinigungen geschlossen werden. Vor allem bei der Untersuchung des Wassers ist es von Bedeutung. Da es auf Platten leicht unter der großen Zahl anderer Bakterien übersehen werden kann, legt man eine Vorkultur in Bouillon an. Zur Übung nimmt man Wasser aus einem schlecht angelegten Brunnen oder einem Flusse.

Kann angenommen werden, daß das Wasser rein ist, so bringt man 100, 50, 3×5 , 5×1 , 5×0.1 cem in Bouillon, die ersteren in gleiche Mengen, letztere in je 10 cem. Ist es stark verunreinigt, so wird es in der Weise verdünnt, daß man 0.5 cem mit 50 cem sterilen Wassers, davon 0.5 wieder mit 50 cem und davon 0.5 cem ebenso verdünnt. Von jedem Kölbchen bringt man 1.0 und 0.1 in je 10 cem Bouillon. Aufbewahren im Brutschrank. Nach 24 Stunden sind ein Teil der Proben gleichmäßig, ein Teil nur oben oder unten, ein Teil nicht getrübt. Nur die ersteren brauchen weiter untersucht zu werden. Man streicht davon auf Lackmus-Nutrose-Milchzuckeragar aus und untersucht

am nächsten Tage die rot gewachsenen Kolonien durch Ausstreichen auf gegossene Gelatineplatten und in Zuckeragar. Wird die Gelatine nicht verflüssigt und der Zucker vergoren, so handelt es sich um ein typisches *B. coli*.

XLII. Übung: Leuchtbakterien.

Zur Züchtung von Leuchtbakterien läßt man einen Seefisch bei Zimmertemperatur liegen, bis er leuchtet. Dann bereitet man sich Agar mit 3% Kochsalz, gießt ihn in Platten und streicht von den Stellen, die am stärksten leuchten, auf eine Anzahl Platten aus. Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Nach 1—3 Tagen untersucht man im dunklen Zimmer (warten, bis sich das Auge an die Dunkelheit gewöhnt hat). Oft kann man jetzt schon Reinkulturen abimpfen; andernfalls streicht man von der Stelle, die am stärksten leuchtet, nochmals auf Salzagarplatten aus. Das Leuchten tritt sehr schön hervor auf schrägem Salzagar und in Salzbouillon, besonders beim Schütteln; auf Salzagarplatten kann man mit den Reinkulturen Figuren zeichnen.

II. TEIL.

Praktikum der Protozoologie.

Einleitung.

Der protozoologische Teil des Praktikums ist in allgemeine, technische und spezielle Abschnitte eingeteilt. Diese Trennung erschien wünschenswert, um die entwicklungsgeschichtliche Darstellung, die meist in den Vordergrund gestellt wurde, nicht auseinander zu reißen. Vorausgeschickt ist ein kurzer Überblick über Bau, Entwicklung und System der Protozoen. Der behandelte Stoff kann, je nach Vorhandensein des Materials und etwaiger Ausdehnung des Studiums auf Details, in 2—3 Wochen bei 2—3stündiger tägiger Arbeitszeit durchgenommen werden. Das Pensum der einzelnen Abschnitte kann bei dieser Einteilung naturgemäß nicht immer an einem Tage erledigt werden; doch können häufig Arbeiten verschiedener Abschnitte an einem Tage nebeneinander in Angriff genommen werden. Die Verteilung des Stoffes auf einzelne Tage muß dabei dem Leiter des Kurses oder beim Selbststudium dem Praktikanten überlassen bleiben. Es empfiehlt sich, den Inhalt eines speziellen Kapitels und die vorausgeschickten allgemeinen und technischen Bemerkungen stets zuvor im Zusammenhang durchzulesen, ehe man mit den praktischen Studien beginnt.

Die Seite 1 und 2 für den bakteriologischen Teil angeführten Materialien sind auch für diesen Teil des Kurses notwendig. Außerdem:

Ein Satz von Gläsern zur Färbung und Weiterbehandlung von Schnitten und Ansstrichen: am besten sind runde Gläser von der Höhe und dem Durchmesser der Objektträger (englisches Format) mit eingeschliffenem Glasstopfen auf einem Brett montiert.

Eine Anzahl Tubusgläser verschiedener Größe mit Korkstopfen zum Konservieren und Aufheben von Material:

Kleine Pipetten mit Gummisängern.

Einige Präpariernadeln.

Kleines Brett oder Wachsbecken zum Präparieren.

Angenehm ist eine Präparierlupe: am besten (aber teurer) ein binoculares Präpariermikroskop von Zeiss.

Zur mikroskopischen Ausrüstung genügen die S. 4 empfohlenen Objektive 3, 6 oder 7 und Immersion $\frac{1}{12}$ von Leitz. Vorzuziehen ist jedoch eine Apochromatimmersion 2 mm von Zeiss mit den Kompensationsocularen 4, 6, 8 und 12. Letztere sind für genauere morpholo-

gische Untersuchungen unbedingt notwendig und auch mit der gewöhnlichen Immersion mit Vorteil verwendbar.

Als bestes Licht zum Mikroskopieren empfiehlt sich Gasglühlicht mit Schusterkugel. Näheres über die Benutzung siehe S. 9.

Vor Benutzung der Ölimmersion orientiere man sich stets mit schwacher oder mittelstarker Vergrößerung über das Präparat. Da die meisten Protozoen im Verhältnis zu den Bakterien ansehnliche Größe aufweisen, so kann man sie schon bei diesen Vergrößerungen gut erkennen und im Präparat auffinden. Näheres über die Benutzung der Immersion siehe S. 10.

Von großer Wichtigkeit ist es, möglichst viel von dem, was man im Mikroskop sieht, zu zeichnen. Dadurch prägen sich nicht nur die gesehenen morphologischen Verhältnisse besser dem Gedächtnisse ein, sondern man lernt auch direkt schärfer beobachten. Man lege das Zeichenheft rechts vom Mikroskop und versuche das Gesehene wiederzugeben. Anfangs wird man in der Regel alles zu klein zeichnen, man gewöhne sich daher, von vornherein alles recht groß zu entwerfen. Als sehr instruktiv erweist sich dabei der Gebrauch von farbigen Stiften zum Hervorheben bestimmter Gebilde, z. B. der Kerne und Kernderivate durch rote Farbstifte.

Es sind folgende Fixierungs- und Farbflüssigkeiten, sowie sonstige Lösungen notwendig, die man sich aus den zum großen Teil S. 4 und 5 angeführten Materialien herstellt.

Fixierungsflüssigkeiten:

Sublimatalkohol nach Schaudinn: zwei Teile konzentrierte wässrige Sublimatlösung (Herstellung s. S. 9) und ein Teil absoluter Alkohol.

Osmiumsäure 2%ig (in rotem Glas mit weitem eingeschlifftem Glasstopfen aufzubewahren).

Platinchloridosmiumessigsäure (Hermannsche Flüssigkeit): Platinchlorid 1 %, 75 cem, Osmiumsäure 2 % 4 cem, Eisessig 1 cem.

Farblösungen:

Boraxkarmin.

Pikrokarmin nach Weigert.

Delafields- oder Grenachers Hämatoxylin.

Giemsalösung.

Löfflers Geißelbeize.

Karbolfuchsin (Herstellung s. S. 9).

Eisenhämatoxylin nach Heidenhain

a) Beiz- und Differenzierungsflüssigkeit: Eisenoxydammoniumsulfat 2.5 g, destil. Wasser 100 cem.

b) Farblösung: Hämatoxylin 1 g, Alkohol 10 cem, destil. Wasser 90 cem (in roter Flasche aufzubewahren und am besten vier Wochen vor Gebrauch herzustellen).

Eisenchlorid-Hämatoxylin nach Weigert

a) Eisenchlorid off. 4 Teile, Salzsäure off. 1 Teil, Wasser 100 Teile.

b) Hämatoxylin 1 g, Alkohol 96 % 100 cem.

Bordeaux-Rot, schwache wässrige Lösung.

Eosin, schwache wässrige Lösung.

Lichtgrün, schwache wässrige Lösung.

} Diese Lösungen am besten fertig bezogen von Dr. Gröbler Leipzig.

Sonstige Flüssigkeiten:

Physiologische Kochsalzlösung (s. S. 9).

Natrium citricum-Lösung $2\frac{1}{2}$ —5 ‰.

Jodalkohol 60 ‰ (Jodzusatz bis zu hellbrauner Färbung).

Salzsaurer Alkohol (0,1 cem Salzsäure auf 100 cem 70 ‰ Alkohol).

Alkohol von 60, 70, 94 und 100 ‰ (Letzteren s. S. 8).

Xylol + Alkohol.

Xylol.

Letztere sieben Flüssigkeiten verwende man auch zum Füllen des auf S. 95 erwähnten Glätersatzes.

Zedernöl.

Kanadabalsam.

Wer sich eingehender über die mikroskopische Technik, insbesondere über die Schnittechnik informieren will, sei auf eines der speziellen Werke wie Böhm und Oppel, „Taschenbuch der mikroskopischen Technik“ oder Lee und Mayer, „Grundzüge der mikroskopischen Technik“ verwiesen.

Allgemeine Übersicht über Bau und Entwicklung der Protozoen.

Die Protozoen sind einzellige Organismen. Ihr Körper, so hoch differenziert er auch in einzelnen Vertretern ausgebildet sein mag, besitzt nur den Formwert einer einzigen Zelle. Wie jede Metazoenzelle weist ein Protozoon die beiden wesentlichen Bestandteile einer solchen auf, nämlich Protoplasma und Kern resp. Kernsubstanzen.

Das **Protoplasma** ist ein kompliziertes Gemisch von flüssigen Substanzen, worunter Eiweißgemenge (Proteine) die für die Lebensvorgänge wichtigsten sind. Der Aggregatzustand des Protoplasmas ist ein zähflüssiger. Die nackte Zelle unterliegt daher vollkommen den physikalischen Gesetzen flüssiger Tropfen.

Am lebenden wie am konservierten und gefärbten Protoplasma läßt sich mikroskopisch ein feinerer Bau nachweisen, der sich als sog. Wabenbau oder alveoläre Struktur erweist. Die Eigentümlichkeit derselben besteht darin, daß in einem innigen Gemenge einer zähflüssigen und einer leichterflüssigen Substanz die erstere kleinste Tröpfchen der letzteren allseitig umschließt in Form von dünnen, miteinander in Verbindung stehenden Flüssigkeitslamellen. Das Protoplasma ist sonach ein schaumartiges Gemenge zweier Flüssigkeiten von verschiedener physikalischer Beschaffenheit. Wie bei allen Schaumgemengen stoßen auch beim Protoplasma stets nur 3 Wabenlamellen aneinander. An der äußeren Oberfläche sowie im Innern um größere Vacuolen oder den Kern stellen sich die Wabenwände entsprechend den Oberflächengesetzen senkrecht zur Oberfläche und bilden dadurch eine Reihe parallelgestellter Waben, den sog. Alveolarsaum.

Häufig kann man an der Protozoenzelle deutlich eine äußere zähere Schicht, das sog. Ectoplasma von dem inneren flüssigeren Entoplasma unterscheiden. Das Ectoplasma kann besonders auf den sog. Pseudopodien direkt homogen erscheinen. In den Wabenwänden finden sich, vor allem im Entoplasma, allerhand körnige oder tropfenförmige Einlagerungen verschiedenster chemischer Zusammensetzung, die sog. Microsome, Plasmosome etc. Dieselben stellen offenbar Stoffwechselprodukte vor. Im Entoplasma treten ferner auch größere Vacuolen auf, die im Dienste des Stoffwechsels stehen und je nach der Ernährungsweise und dem Grade der Verdauung feste oder gelöste Stoffwechselprodukte enthalten. Eine besondere Bedeutung kommt den sog. contractilen Vacuolen zu, die sich periodisch entleeren und wieder anfüllen und die als Exkretorganellen aufzufassen sind. Sie kommen nur bei Protozoen vor.

Ferner finden sich in dem Protoplasma vielfach faserige oder fibrilläre Differenzierungen von vermutlich elastischer Beschaffenheit: sie sind

zweifelloso Bestandteile des lebenden Protoplasmas und entwickeln sich in den Wabenwänden vermutlich unter Hinzutreten von Kernsubstanzen, wie wir später an einem Beispiel noch genauer sehen werden. Das Protoplasma ist nämlich ein zweiphasiges Gemisch, das die Fähigkeit hat, teilweise aus dem flüssigen oder Solzustande in den festen oder halbfesten Gelzustand überzugehen. Durch die im Gelzustand befindlichen, elastischen Differenzierungen wird auch die spezifische Gestalt der unbeschalteten Protozoenzelle bedingt, die ohne dieselben in Anbetracht des flüssigen Aggregatzustandes Kugelform einnehmen müßte. Die Bedeutung dieser Gebilde für die Bewegung sowie die Bewegungserscheinungen überhaupt, werden im speziellen Teil erörtert werden.

Kern. Der zweite unerläßliche Bestandteil jedes Protozoons ist der Kern resp. die Kernelemente. Der Kern ist im einfachsten Falle ein bläschenförmiges Gebilde, das sich von dem übrigen Protoplasma vor allem durch den Gehalt einer besonderen mit gewissen Farbstoffen sich intensiv färbenden Substanz unterscheidet, das Chromatin, dem eben dieser Name infolge seiner Farbstoff aufnehmenden Eigenschaft beigelegt wurde. Es ist eine vorwiegend aus Nuclein bestehende Substanz, die sich meist in Form von einzelnen Körnern, Fäden oder größeren Kugeln vorfindet.

In der Regel sind die Chromatinkörner, besonders die größeren kugeligen, mit einer zweiten Kernsubstanz vermischt, gewissermaßen zusammengebacken, dem Plastin oder Paranuclein. Dasselbe ist die Substanz der echten Nucleolen oder Kernkörperchen der Metazoenzelle und kann auch wie dort in einem oder mehreren Körperchen gesondert im Kern vorkommen.

Häufig ist ein großer Teil des Chromatins und Plastins zu einem einheitlichen stark färbbaren kugeligen Körper im Innern des Kernes vereinigt, das den indifferenten Namen: Binnenkörper oder Caryosom erhält. An demselben spielen sich im Laufe des Lebens komplizierte Veränderungen ab, die teils in einer Abgabe, teils in einer Aufspeicherung seiner Komponenten bestehen. Diese Veränderungen können bei manchen Formen in vollkommen zyklischer Weise vor sich gehen.

Die Chromatin- und Plastinsubstanzen liegen eingebettet in einem feinen, nicht färbbaren Gerüst, oder richtiger Wabenwerk, dem Linin oder der achromatischen Substanz. Diese steht vermutlich der Waben-substanz des Protoplasmas sehr nahe. Die Lininwaben sind ausgefüllt durch den sog. Kernsaft.

Eine eigentliche Kernmembran, die das Kernbläschen gegen das übrige Protoplasma abschließt, ist teils vorhanden, teils nicht, macht also keinen wesentlichen Bestandteil des Kernes aus.

Durch physiologische Zustandsänderungen oder im Laufe der regulären Entwicklung kommt es häufig zu einem Austritt von chromatischer Substanz in das Protoplasma, wo sie in verschiedenster Form als Körnchen, Stränge, Brocken, Netze etc. der Wabensubstanz eingelagert sein kann. Diese Chromatinelemente im Protoplasma werden Chromidien genannt. Sie können bei manchen Formen dauernd vorkommen und manchmal den Kern vollkommen ersetzen, so daß erstere in gewissem Sinne kernlos erscheinen. Zu bestimmten Zeiten können dann aus dem Chromidialapparat sich wieder typische Kerne herausbilden.

Es hat sich herausgestellt, daß es chromatische Substanz von verschiedener physiologischer Bedeutung gibt. Einmal das Chromatin, das nur vegetativen Vorgängen vorsteht, das sog. somatische Chromatin.

andererseits die Substanz, die bei der Befruchtung in Wirksamkeit tritt und die aus sich heraus (als Vererbungssubstanz) alle Differenzierungen und mithin auch das somatische Chromatin wieder hervorbringen kann, das generative Chromatin. Bei den Ciliaten sind die beiden Chromatinelemente während des ganzen Lebens auf zwei besondere Kerne verteilt; bei andern Formen tritt diese Sonderung nur in gewissen Stadien des sog. Entwicklungszyklus auf. Auch den Chromidien kann diese zweifache physiologische Bedeutung zukommen, es gibt somatische Chromidien und Geschlechtchromidien.

Außerdem kann noch in anderer Weise eine Kernduplizität auftreten, die von der eben besprochenen wohl zu unterscheiden ist. Es findet sich nämlich besonders bei Flagellaten vielfach ein zweiter kleinerer Kern, der hauptsächlich von dem Caryosom eines ursprünglich einheitlichen Kernes abstammt, es ist der sog. Blepharoplast, der den lokomotorischen Apparat der Zelle aus sich hervorbringt und deshalb auch lokomotorischer Kern genannt werden kann im Gegensatz zu dem mehr vegetativen Hauptkern. Beide Kerne, der Hauptkern wie der Blepharoplast, enthalten hierbei somatisches und generatives Kernmaterial zugleich und der Unterschied betrifft mehr den Platingehalt, der beim Blepharoplasten größer ist, und steht zugleich mit der sexuellen Kerndifferenzierung im Zusammenhang, wie wir im speziellen Teil an einigen Beispielen sehen werden.

Aus diesen kurzen Erörterungen geht schon hervor, daß der Bau der Kerne und die Differenzierungen der chromatischen Substanzen bei den Protozoen ungemein mannigfaltig sein können. Ebenso mannigfaltig sind auch die Kernteilungsvorgänge bei diesen Organismen. Es finden sich die verschiedenartigsten Übergänge zwischen einer scheinbar einfachen amitotischen Durchschmürung des Kernes bis zu hoch ausgebildeten Mitosen, die denen der Metazoen vollkommen gleichen können und somit eine bestimmte Anzahl sich spaltender Chromosomen, eine Spindelfigur und Centrosome an den Polen derselben aufweisen.

Centrosoma. Diese letzteren Zellorganoide, die Centrosome, die bekanntlich bei der Metazoenzelle stets vorhanden sind, fehlen vielfach bei den Protozoen. Hier können sie durch einen Teil des schon erwähnten Caryosoms ersetzt sein, das als Centralspindel plus Centrosom bei der Kernteilung eine Art stemmende Wirkung auszuüben scheint. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß hierbei ein Centrosom dauernd im Caryosom des Kernes eingeschlossen ist. Die Frage ist noch nicht völlig geklärt, doch erscheint die Tatsache von Bedeutung, daß in den Fällen, wo bei Protozoen echte Centrosome auftreten, diese ihren Ursprung aus dem Kern nehmen. Das Caryosom steht ferner, wie schon oben erwähnt, mit dem Blepharoplasten resp. den sog. Basalkörpern — ähnliche, nur kleinere stark färbbare Körperchen an der Basis der lokomotorischen Organe — in genetischem Zusammenhang, indem dieselben aus einem ursprünglich einheitlichen Kern unter vorwiegender Beteiligung des Caryosoms hervorgehen. Damit läßt sich die besonders aus dem Verhalten des Blepharoplasten bei der Zellteilung sowie bei der Spermatogenese der Metazoen erschlossene Beziehung zu dem Centrosoma aufs beste in Einklang bringen, da beides, Blepharoplast wie Centrosom, Kernderivate sind. Auf diese Weise können die drei kinetischen Zellorgane, Caryosom, Blepharoplast und Centrosom, wenigstens morphologisch, einheitlich verstanden werden.

Die **Fortpflanzung** der Protozoen geschieht stets durch Teilung (Zellteilung) und die verschiedenen Modifikationen derselben. Jede Zell-

teilung ist hier zugleich ein Fortpflanzungsakt. Die einfachste Art ist die Zweiteilung, die bei Formen mit spezifischer Gestalt als Längs- oder Querteilung vor sich gehen kann. Eine Modifikation der Zweiteilung ist die sog. Knospung und Knospungsteilung, bei der ein kleineres Stück von einem größeren abgeschnürt wird. Durch rasch hintereinander folgende, häufig unvollständige Teilungen kommt die sog. multiple Fortpflanzungsweise zustande, wodurch eine geringere oder größere Anzahl Kindindividuen zugleich entstehen. Der extremste Fall einer multiplen Fortpflanzungsweise ist der, daß die Elterzelle mit ihrem Kern auf einmal in eine Anzahl Sprößlinge zerfällt, die sog. Zerfallsteilung. In manchen Gruppen finden sich alle Übergänge von einer fortgesetzten, sich rasch folgenden Zweiteilung bis zu den erwähnten Zerfallsteilungen. Letztere werden in manchen Fällen Schizogonie genannt und ihre Produkte Merozoiten. In andern Fällen wo diese Teilungen innerhalb einer Cyste (gewöhnlich nach einer Befruchtung) vor sich gehen, spricht man von Sporogonie und Sporozoiten. Im speziellen Teil werden wir eingehend die verschiedenen Modifikationen der Fortpflanzung kennen lernen.

Befruchtung. Ursprünglich unabhängig von der Fortpflanzung, einfach zwischen eine Anzahl Teilungen eingeschoben, finden sich bei allen Protozoengruppen Befruchtungsvorgänge. Das Wesen derselben besteht wie bei den Metazoen in der Verschmelzung zweier, vermutlich geschlechtlich verschiedener Kerne, deren Chromatinmenge, resp. Chromosomenzahl sich zuvor durch besondere Teilungen reduziert hat. Zum Wesen eines Befruchtungsvorganges gehört also neben der Kernverschmelzung, der Caryogamie, die vorausgegangene (ev. auch gleichzeitige oder folgende) Reduktion der chromatischen Substanz der beiden verschmelzenden Kerne.

Im einzelnen sind die Befruchtungsvorgänge bei den Protozoen äußerst mannigfaltig ausgebildet. Sie lassen sich einteilen in: Copulation, Conjugation und Antogamie.

Die Copulation schließt sich vollkommen den Verhältnissen an, wie wir sie bei den Metazoen kennen. Bei ihr verschmelzen zwei ganze Zellen miteinander. Die miteinander verschmelzenden Zellen werden Gameten genannt, das Produkt der Verschmelzung Copula oder Zygote und der aus der Vereinigung der beiden Kerne hervorgegangene neue Kern Syncarion.

Kopulieren zwei morphologisch nicht unterscheidbare Zellen (eine physiologische Verschiedenheit braucht dabei jedoch nicht ausgeschlossen zu sein!), so spricht man von Isogamie und Isogameten. Dieselbe findet sich sowohl bei völlig erwachsenen, gewöhnlichen vegetativen Individuen als auch eigens dazu gebildeten, meist kleineren Formen, die zudem noch durch eine besondere Modifikation der Fortpflanzung entstehen können. Die zweite Hauptgruppe der Copulation ist die Anisogamie, bei der zwei auch morphologisch unterscheidbare Individuen kopulieren, die als männliche Microgameten und weibliche Macrogameten unterschieden werden können. Es finden sich bei den Protozoen alle Zwischenstufen von ganz gering ausgebildeter, geschlechtlicher Verschiedenheit bis zur ausgesprochenen Oogamie oder Eibefruchtung durch spermatozoenartige Microgameten wie bei den Metazoen.

Solange die Gameten noch keine Kernreduktion erfahren haben, pflegt man sie als Gametocyten zu bezeichnen, bei Anisogamie speziell als Macro- und Microgametocyten. Entweder wird der Gametocyt direkt zum Gameten (z. B. Macrogamet der Coccidien und Hämosporidien)

oder aber die Reduktion vollzieht sich Hand in Hand mit einer Vermehrung (z. B. Microgametenbildung der Coccidien und Hämospordien und Macro- und Microgametenbildung der Gregarinen). In manchen Fällen spielt sich die Reduktion in genau derselben Weise ab, wie bei der Ei- und Samenreife der Metazoen, nämlich durch 2 aufeinanderfolgende Reifeteilungen, wodurch die Zahl der Chromosomen auf die Hälfte reduziert wird.

Die zweite Modifikation der Befruchtungsvorgänge ist die Conjugation, die sich ausschließlich bei den Ciliaten findet. Dabei verschmelzen zwei erwachsene Individuen an der Mundöffnung zeitweilig miteinander. Der Geschlechtskern eines jeden Individuums macht seine Reduktionsteilungen durch, teilt sich hierauf nochmals, worauf der eine der eben hervorgegangenen Kerne als Wanderkern (männlicher Kern) je in das andere Individuum überwandert, um dort mit dem zurückgebliebenen, stationären (weiblichen) Kern zu verschmelzen. Nach der gegenseitigen Kernverschmelzung trennen sich dann wiederum die beiden Individuen. Es handelt sich also um eine Doppelbefruchtung, die dadurch möglich ist, daß die Zelleiber nicht dauernd verschmelzen, sondern je ihren männlichen Kern austauschen.

Die dritte Modifikation ist die Autogamie oder Selbstbefruchtung, die gleichfalls ausschließlich auf die Protozoen (Rhizopoden und Flagellaten) beschränkt ist. Sie vollzieht sich meist innerhalb einer Cyste und ihr Wesen besteht darin, daß der Kern eines einzigen Individuums sich zunächst in zwei Kerne, die Gametenkerne, teilt, die hierauf nach Ausstoßung je zweier Reduktionskerne wieder miteinander zu einem einzigen Syncarion verschmelzen. Dieser Vorgang spielt sich also in einem einzigen Individuum ab.

Eine gewisse Ähnlichkeit damit haben Vorgänge, wie sie sich bei der Parthenogenese finden. Als Parthenogenese bezeichnet man eine Fortpflanzung von weiblichen Gameten (Macrogameten, Eiern) ohne vorhergegangene Befruchtung. Dieselbe ist auch bei Protozoen weit verbreitet. Dabei vollzieht sich die Reduktionsteilung, aber ein Teil der Reduktionskerne verschmilzt hierauf wieder mit dem Gametenkern, wodurch ein ähnlicher Effekt wie bei der Befruchtung erzielt wird.

Wie schon eingangs betont, hat die Befruchtung mit der Fortpflanzung ursprünglich gar nichts zu tun; das ist besonders bei den Formen, bei denen sich die Befruchtung als Autogamie oder Conjugation abspielt, klar ersichtlich. Die Art der Fortpflanzung ist in all diesen Fällen vor und nach der Befruchtung stets dieselbe und man kann dann nur von einer agametischen Fortpflanzung und einem zwischen eine Reihe von Generationen eingeschobenen Befruchtungsvorgang reden. Von einer geschlechtlichen Fortpflanzung, einer Gametogonie, kann nur dann gesprochen werden, wenn sich in allmählicher Anpassung an die Befruchtungsvorgänge, speziell die Copulation, besondere Geschlechtsformen (Gameten) herausgebildet haben, die auf andere Fortpflanzungsweise hervorgebracht werden als die gewöhnlichen Individuen, so daß sie nach Bau und Entstehung sich von diesen unterscheiden.

Encystierung. Eine weitverbreitete Erscheinung bei den Protozoen ist die sog. Encystierung, d. i. die Bildung einer festen, widerstandsfähigen Hüllschicht um die sich zuvor meist kugelig zusammenziehende Zelle. Die Cyste dient der Protozoenzelle in erster Linie als Mittel, ungünstige äußere Lebensbedingungen zu überdauern und ist demnach eine Schutzvorrichtung. Bei parasitischen Formen spielen die Cysten eine

große Rolle, indem durch sie meistens die Neuinfektion bewerkstelligt wird. Die Cyste ist hier notwendig, da ja die Parasiten vielfach an ihren Wirt so angepaßt sind, daß die außerhalb desselben nicht zu existieren vermögen. Häufig vollziehen sich innerhalb der Cyste auch Fortpflanzungs- und Befruchtungsvorgänge. Wir haben also nicht nur Schutz-, sondern auch Fortpflanzungs- und Befruchtungscysten. Für die ausschließlich parasitische Formen enthaltenden Sporozoen sind Cystenzustände besonders charakteristisch und gewöhnlich sind sie noch dadurch ausgezeichnet, daß die Fortpflanzungsprodukte gleichfalls mit festen Hüllen umgeben sind, die als Sporen (Sporocysten) bezeichnet werden. Daher kommt auch der für diese multiple Fortpflanzungsweise schon früher erwähnte Name Sporogonie.

Entwicklungszyklus. Die ganze Reihe von Generationen einer Protozoenspezies von einem Befruchtungsakt zum andern bildet den sog. Zeugungs- oder Entwicklungskreis dieser Art. In Fällen, wo mit der Befruchtung eine ausgesprochene Gametogonie ausgebildet ist, nimmt der Zeugungskreis die Form eines typischen Generationswechsels an, bei dem ungeschlechtliche Generationen mit einer Geschlechtsgeneration abwechseln. Der Generationswechsel kann noch komplizierter werden, indem noch weitere Generationen eingeschoben werden, die spezifisch ausgebildet und an spezielle Verhältnisse angepaßt sind, so z. B. an die Neuinfektion (Cyste, Sporogonie) oder an das Leben in einem zweiten Wirt (Zwischenwirt).

System der Protozoen.

Stamm: **Protozoa.**

I. Unterstamm: **Plasmodroma** (Doflein).

1. Klasse: **Rhizopoda** (v. Siebold).

1. Ordnung: ***Amoebina** (Ehrenberg). (Hierher Dysenterieamöben).
2. Ordnung: **Foraminifera** (d'Orbigny).
3. Ordnung: **Heliozoa** (Haeckel).
4. Ordnung: **Radiolaria** (Joh. Müller).
5. Ordnung: **Mycetozoa** (de Bary).

2. Klasse: **Mastigophora** (Diesing).

1. Unterklasse: **Flagellata** (Cohn em. Bütschli).

1. Ordnung: ***Protomonadina** (Blochmann).
2. Ordnung: ***Polymastigina** (Bütschli und Blochmann) (Hierher Trichomonas).
3. Ordnung: ***Binucleata** (Hartmann). (Hierher die Blutparasiten).

Anhang: ***Spirochaeta.**

4. Ordnung: **Englenoidea** (Klebs).
5. Ordnung: **Chromomonadina** (Blochmann).
6. Ordnung: **Phytomonadina** (Blochmann).

2. Unterklasse: **Dinoflagellata** (Bütschli).

3. Unterklasse: **Cystoflagellata**.

Anhang: **Trichonymphidae** (Leidy).

3. Klasse: **Telosporidia** (Schaudinn).

1. Ordnung: ***Coccidia** (Leukart).

2. Ordnung: ***Gregarinida** (Aimé Schneider).

4. Klasse: **Neosporidia** (Schaudinn).

1. Ordnung: **Cnidosporidia** (Doflein).

2. Ordnung: **Sarcosporidia** (Balbiani)

II. Unterstamm: **Ciliophora** (Doflein).

1. Klasse: **Ciliata**.

1. Ordnung: **Holotricha** (Stein).

2. Ordnung: ***Heterotricha** (Stein).

3. Ordnung: **Oligotricha** (Bütschli).

4. Ordnung: **Hypotricha** (Stein).

5. Ordnung: **Peritricha** (Stein).

2. Klasse: **Suctoria**.

Die Ordnungen, die parasitische Formen enthalten, sind fett gedruckt; diejenigen, von denen Vertreter im speziellen Teil des Praktikums besprochen werden, sind zudem mit einem Stern bezeichnet.

I. Amöbina.

Allgemeines.

Als Amöben bezeichnet man eine Gruppe von Protozoen von unbestimmter, stark veränderlicher Gestalt, die sich durch sog. Pseudopodien bewegen. Die Pseudopodien sind Protoplasmafortsätze, die bald hier, bald da an der Oberfläche hervortreten und dadurch eine vollständig ungeordnete Bewegung der Zelle herbeiführen. Die Form der Pseudopodien ist in der Regel für jede Art eine ganz bestimmte: so gibt es breite, lappige, spitze etc. Pseudopodien, solche mit und ohne Entoplasma. Immerhin ist die Form keine absolut konstante, da verschiedenes Medium sie verschieden beeinflussen kann. Das Aussenden pseudopodienartiger Fortsätze kommt durch lokale Herabsetzung der Oberflächenspannung zustande (durch welche Stoffwechselvorgänge oder sonstige Einwirkung das hervorgerufen wird, ist dabei gleichgültig). Es muß rein physikalisch an einer solchen Stelle ein Plasmafortsatz hervorfleßen, dessen GröÙe und Form einerseits von der Spannungsänderung, andererseits von der Kohäsion des übrigen Protoplasmas und der umgebenden Flüssigkeit abhängig ist.

Die Nahrungsaufnahme geschieht durch Umfließen benetzbarer, fester Nahrungskörper mittels der Pseudopodien, wobei dieselben physikalischen Komponenten mitsprechen wie bei der Bewegung.

Den Bau von Protoplasma und Kern, sowie die Fortpflanzung und Befruchtung werden wir im speziellen Abschnitt an einzelnen Beispielen kennen lernen.

Technische Bemerkungen.

Material. Reiches Material von Amöben ist nicht immer leicht zu bekommen. Die *Entamoeba buccalis* aus dem Zahnbelag des Menschen ist bei fleißigem Suchen zwar in der Regel zu finden, aber meist nur in wenigen Exemplaren, während die Darmamöben bei uns ziemlich selten sind, vor allem die Dysenterie-Amöbe. Hat man einmal Darmamöben, dann kann man durch Verfütterung von Cysten an Katzen oder durch hohe Klismata mit flüssigem, amöbenhaltigem Stuhl reichlicheres Material sich verschaffen. Sind keine parasitischen Formen aufzutreiben, so untersuche man Amöben aus Stroh-, Loh- oder Erdefusionen resp. aus der Cloake von Eidechsen, die man in der weiter unten zu besprechenden Weise züchten kann.

Herstellung von frischen Präparaten. Zum Studium der Amöben ist die Untersuchung in vivo von größter Wichtigkeit. Das geschieht am besten in den natürlichen Flüssigkeiten: nur wenn absolut nötig, setze man einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zu. Man entnimmt einen Tropfen des Materials mit der geglühten Platinnadel oder -Öse und fertigt einen hängenden Tropfen. Zweckmäßiger ist es, einen größeren Tropfen des Ausgangsmaterials auf ein Deckglas zu bringen, dasselbe mit der beschickten Seite auf einen planen Objektträger aufzulegen und sofort mit Wachs oder Vaseline zu umranden.

Herstellung von Dauerpräparaten. Bei Anfertigung von Dauerpräparaten ist vor allem zu beachten, daß dieselben niemals trocken werden. Sie müssen feucht fixiert und stets feucht weiterbehandelt werden. Am besten fertigt man dünne Deckglasausstriche und läßt sie sofort mit der bestrichenen Seite nach unten horizontal auf die auf etwa 50° erhitze Fixierungsflüssigkeit fallen. Man fixiert in:

a) Sublimatalkohol (nach Schaudinn) b) Hermannscher Flüssigkeit. (dinn). Man läßt das Präparat einige Sekunden in der Fixierung einige Sekunden. Auswaschen in destilliertem Wasser wäscht in 60% Jodalkohol aus ($\frac{1}{2}$ St.) (etwa 10 Min.). Überführen in 60%, und führt in 70% Alkohol über. dann in 70% Alkohol.

In 70% Alkohol können die fixierten Präparate längere Zeit aufbewahrt werden. Will man gleich färben, so bringt man sie nach wenigen Minuten in destilliertes Wasser zurück. Man färbt mit:

1. stark verdünntem Delafieldschen oder Grenacherschen Hämatoxylin $\frac{1}{2}$ bis mehrere Stunden event. über Nacht je nach der Verdünnung. Hierauf spült man in Brunnenwasser gut ab und prüft ein Präparat unterm Mikroskop. Ist es überfärbt, so differenziert man mit salzsaurem Alkohol und kontrolliert unterm Mikroskop, bis die richtige Färbung erreicht ist. Dies ist dann der Fall, wenn die Kerne scharf zu erkennen sind. Hierauf abermaliges Abspülen mit Brunnenwasser. Überführen durch 70%, 94%, 100% Alkohol Xylol + Alkohol in Xylol (je 1 Minute) und Einschließen in Cedernholzöl oder Kanadabalsam.
2. Boraxkarmin oder Pikrokarmin nach Weigert. Färbung etwa $\frac{1}{2}$ Stunde. Hierauf Differenzierung mit salzsaurem Alkohol, bis sich keine Farbstoffwolken mehr bilden. Dann durch die Alkoholstufen und Xylol in Zedernholzöl.
3. Heidenhains Eisenhämatoxylin (s. S. 96), wodurch die am stärksten differenzierten Färbungen erzielt werden. Die Ausstriche kommen aus dem dest. Wasser für 4—12 Stunden (event. über Nacht) in die Eisenalaunbeize; dann spült man gut mit dest. Wasser ab und bringt sie auf 6—12 Stunden in die Farblösung, wo sie ganz schwarz werden. Hierauf wieder mit Wasser auswaschen und dann in der Eisenbeize die überflüssige Farbe ausziehen, was sehr rasch vor sich geht. Der richtige Zeitpunkt der Differenzierung muß unter dem Mikroskop festgestellt werden. Man legt den Deckglasaufstrich auf einen großen Tropfen der Beizlösung auf den Objektträger und beobachtet im Mikroskop, bis die Kerne scharf differenziert sind. Das Chromatin der Kerne muß tief-schwarzblau erscheinen, das Protoplasma schwachgran (s. Fig. 2). Dann tüchtig abspülen in Leitungswasser und nach den Alkoholstufen und Xylol in Kanadabalsam oder Zedernöl einbetten.

4. Eisenchlorid-Hämatoxylin nach Weigert (S. 96). Man bringt die Präparate aus dem Wasser auf 10—20 Min. in eine Mischung von gleichen Teilen von a) Eisenchlorid-Salzsäure-Lösung und b) alkoholischer Hämatoxylin-Lösung (s. S. 96), die aber 20 Min. vor Gebrauch herzustellen ist. (Die Mischung kann dann mehrere Tage verwendet werden). Hierauf Abspülen in Brunnenwasser und durch Alkoholstufen und Xylol in Zedernöl. Diese letztere sehr bequeme Methode (die aber leider nicht für alle Objekte verwendbar ist), liefert ohne Beizung und Differenzierung ähnliche Resultate wie die Heidenhainsche Eisenhämatoxylin-Färbung und ist daher in erster Linie zu empfehlen, nur wo sie versagt, greife man zur Heidenhainschen Eisenhämatoxylin-Färbung. Die Färbungen 1 und 2 dienen hauptsächlich zur Kontrolle beim Studium der Chromidien etc.

Einige Präparate färbe man, bevor man sie durch die Alkoholstufen führt, kurze Zeit (1 Minute) mit einer Plasmafarbe nach. Z. B. Eosin nach der Delafieldfärbung, Lichtgrün nach Karmin und Bordeauxrot nach Eisenhämatoxylin. In derartigen Präparaten nehmen die Nahrungseinschlüsse, z. B. rote Blutkörperchen, schöne Kontrastfärbungen an.

Kleine Darmstücke von an Amöbendysenterie gestorbenen Menschen oder Katzen, sowie Schleimflocken aus Dysenteriestühlen fixiert man in toto in heißem Sublimatalkohol ($\frac{1}{2}$ Stunde) wäscht sie in Jodalkohol aus (24 Stunden) bringt sie durch Alkoholstufen in Xylol (je einige Stunden) bettet in Paraffin ein (s. S. 27) und zerlegt sie in Schnitte von 5—10 μ Dicke (s. S. 23). Bezüglich weiterer Methoden der Schnittechnik sei auf eines der S. 96 erwähnten Lehrbücher verwiesen. Die Färbung der Schnitte geschieht wie die der Ausstriche.

Kulturen von Amöben kann man leicht aus Stroh-, Erd- oder Lohinfusionen sowie aus dem ausgepreßten Cloakeninhalt von Eidechsen anlegen. Erd- oder Lohinfusionen stellt man in der Weise her, daß man etwas Gartenerde oder Lohe in einem Wasserglas mit Wasser anrührt und in den Thermostaten von 25° stellt. Am nächsten Tag findet man in der Regel in dem Häutchen an der Oberfläche kleine Amöben: man entnimmt einige Ösen davon, verrührt sie mit etwas Wasser im Reagensglas und verteilt hierauf auf Agarplatten von folgender Zusammensetzung: Agar 0,5, Leitungswasser 90,0, gewöhnliche alkalische Nährbouillon 10,0. Binnen wenigen (1—2) Tagen haben sich die Amöben bei 25° auf dem sich gleichzeitig entwickelnden Bakterienrasen stark vermehrt und über die ganze Platte verbreitet. Den Cloakeninhalt von Eidechsen streicht man direkt auf die Agarplatten aus. Aus dem in den Kulturen gewonnenen Material stellt man einfache Klatschpräparate (gut andrücken!) her und fixiert und färbt in der oben angegebenen Weise. (Ist bei Erdamöben unmöglich, da sie nicht haften bleiben. Hier schneidet man am besten kleine Stückchen aus dem Agar, die man wie die Darmstücke in toto fixiert und in Schnitte zerlegt).

Spezieller Kurs.

Entamoeba buccalis (v. Prowazek).

Fast jeder Mensch beherbergt in der Mundhöhle diese Amöbe, wo sie im Zahnbelag, besonders in kariösen Zähnen lebt. Allerdings be-

darf es manchmal der Durchmusterung vieler Präparate, ehe man sie findet, und es wechselt die Häufigkeit ihres Auftretens bei einem und demselben Menschen oft ungemein. Man nehme zur Untersuchung mit der ausgeglühten Platinnadel etwas Zahnschleim unter dem Zahnfleisch oder aus kariösen Zähnen und prüfe zunächst in vivo bei mittlerer Vergrößerung. Die Amöbe läßt sich leicht an den Bewegungen mittelst der breiten, bruchsackartig hervorbrechenden Pseudopodien erkennen. Auch im Ruhezustande ist sie durch ihre Größe ($6-30\ \mu$) und vor allem durch die starke Lichtbrechung von Leukocyten, mit denen sie allein verwechselt werden könnte, leicht zu unterscheiden. Sind Amöben vorhanden, so fertige man dünne Ausstriche (Fixierung und Färbung, s. S. 105 u. 106).

Man untersuche nun die frischen Präparate zunächst noch mit Ölimmersion. Man erkennt deutlich ein mehr oder minder ausgebildetes, helles stark lichtbrechendes Ectoplasma, das auch in der Ruhe scharf vom Entoplasma gesondert ist (Fig. 1). Es erscheint im Leben völlig homogen. Häufig kann man am Ectoplasma, besonders wenn es starke Pseudopodien bildet, noch eine schmale helle Zone an der Peripherie unterscheiden. In gefärbten Präparaten kann man größtenteils einen alveolären Bau des Ectoplasmas beobachten (Fig. 2). (Am besten in den mit Hermannscher Flüssigkeit fixierten.)

Das Entoplasma ist mit einer großen Menge von Nahrungselementen erfüllt, wodurch die wabige Struktur im Leben schwer zu erkennen ist. Eine contractile Vacuole fehlt.

Die Bewegung der Amöbe ist sehr mannigfach; häufig fließt sie mit einem einzigen großen Pseudopodium nach einer Richtung, dann ent-

Fig. 1. *Entamoeba buccalis* (v. Prowazek). Dasselbe Individuum nach dem Leben in drei aufeinanderfolgenden Bewegungsstadien. Vergr. 1200:1. Original.

Fig. 2. *Entamoeba buccalis* (v. Prowazek). Fixiert u. gefärbt. Vergr. 1500:1. Nach v. Leyden und Löwenthal.

stehen plötzlich an einer andern Stelle bruchsackartige Ectoplasmavorwölbungen, in die das übrige Plasma nachströmt. In der obenstehenden Fig. 1a—c sind drei knrz aufeinanderfolgende Stadien der Bewegung von demselben Individuum wiedergegeben. Die Nahrung der Amöbe besteht in den verschiedenartigsten Bakterien der Mundhöhle, hauptsächlich aber in Leukocyten und Leukocytenresten. Die Nahrungsaufnahme geschieht durch Umfließen der Nahrungselemente durch die Pseudopodien, die Verdauung im Innern des Entoplasmas in Nahrungsvacuolen (Fig. 1). Die unverdauten Nahrungselemente (Kernsubstanzen der Leukocyten) werden ausgestoßen, was meist ganz plötzlich geschieht.

Der Kern ist bläschenförmig und besitzt wie bei der später zu besprechenden *Entamoeba coli* eine dicke Kernmembran. Die deut-

liche Erkennung des Kerns im Leben hängt von dem mehr oder minder reichlichen Nahrungsinhalt der Amöben ab, der z. B. auch in unserer Fig. 1 die Unterscheidung unmöglich macht. Chromatin findet sich im Kern viel weniger reichlich als bei der *Entamoeba coli*. Es ist teils an der Membran, meist in einzelnen Segmenten angelagert, teils befindet es sich im Zentrum in einem kleinen Binnenkörper. Zwischen letzterem und der Membran ist ein feines Liniennetzenwerk ausgespannt (Fig. 2).

Die Vermehrung erfolgt durch einfache Zweiteilung, die sehr selten zu beobachten ist, da sie ungemein rasch vor sich geht. Unter reichem Material kann man manchmal Bilder der Kernteilung in gefärbten Präparaten zu Gesicht bekommen. Der Binnenkörper (Carvoso) teilt sich dabei durch eine Mitose, während der ganze Kern sich einfach amitotisch durchschnürt.

Auch eine Chromidienbildung, ein Übertreten chromatischer Substanz aus dem Kern ins Protoplasma, kommt vor, die so weit gehen kann, daß der Kern völlig verschwindet. Das weitere Schicksal dieser Chromidialtiere ist noch nicht bekannt. Ihr Studium wird dadurch erschwert, daß Nahrungselemente (Bakterien) und Stoffwechselkörnerchen sich gleichfalls mit Kernfarbstoffen stark färben und so leicht zu Verwechslungen führen können.

Entamoeba coli (Lösch).

Diese Amöbe findet sich im Darm gesunder Menschen, je nach der Gegend in sehr verschiedener Häufigkeit (z. B. in Berlin bei höchstens 20%). Sie kommt im vegetativen Zustande normalerweise nur im oberen und mittleren alkalisch reagierenden Abschnitt des Colon vor, kann aber durch Darreichung von Abführmitteln zutage gebracht werden.

Zur Herstellung von Präparaten entnehme man eine Öse von den schleimigen Massen des Stuhles und verdünne event. mit physiologischer Kochsalzlösung. Das Material soll spätestens 1—2 Stunden nach Entleerung des Stuhles untersucht werden und zwar am besten auf heizbarem Objektisch, da sonst die Amöben sich kaum bewegen und rascher absterben. Im übrigen gelten die S. 105 u. 106 angegebenen Vorschriften zur Herstellung von Präparaten. Enthält der Stuhl Amöben, so kann man sie, wie die *Entamoeba buccalis*, schon bei schwächerer Vergrößerung an denselben Eigenschaften erkennen, nämlich an der Bewegung (bei geheiztem Objektisch von 37°), Größe (8—70 μ) und starken Lichtbrechung.

Von der *Entamoeba buccalis* und in gleicher Weise von der Dysenterieamöbe unterscheidet sich

diese Form dadurch, daß in der Ruhe eine Sonderung in Ecto- und Entoplasma nicht vorhanden ist (Fig. 3a). Dieselbe tritt nur bei der Bewegung zutage, doch ist das ectoplasmatische Pseudopodium auch dann immer noch schwächer lichtbrechend, als bei den zwei anderen Formen und macht auch einen leichtflüssigeren Eindruck.

a b

Fig. 3. **Entamoeba coli** (Lösch). a nach dem Leben, Ruhezustand. b Cyste mit acht Kernen. Nach Casagrandi u. Barbagallo.

Der Kern hat, wie bei der *buccalis*, eine derbe Membran, zeichnet sich aber durch größeren Chromatingehalt aus; im Leben ist er in der Regel gut zu sehen (Fig. 3a). Der feinere Bau ist sehr mannigfach und weist meistens ein großes Caryosom auf, aus dem das Chromatin allmählich heraustritt und sich nach und nach in größeren Brocken an der Kernmembran ansammelt (Fig. 4, 2).

Der ganze Entwicklungszyklus ist sehr kompliziert und ohne ausgedehnte Studien nicht im Zusammenhang zu verfolgen. Bei der folgenden kurzen Besprechung derselben ist auf die Stadien, die häufiger zur Beobachtung gelangen, besonders hingewiesen.

Die Vermehrung der vegetativen Formen ist eine zweifache, einmal eine einfache Zweiteilung mit einer Amitose des Kerns (Fig. 4, 3a), dann eine Zerfallteilung oder Schizogonie in meist acht Teilstücke (Fig. 4, 1—5). Beide können nebeneinander vorkommen. Die der Schizogonie vorausgehende Kernvermehrung vollzieht sich in der Weise, daß sich zunächst die chromatische Substanz in acht Portionen an der Kernmembran ansammelt, die nach Auflösung der letzteren im Plasma zerstreut werden. Es entstehen daraus acht Tochterkerne. Diese Vermehrungsweise ist sehr charakteristisch für unsere Form und man wird bei reichem Material an gefärbten Präparaten öfters einzelne Stadien dieses Prozesses zu beobachten die Gelegenheit haben.

Bei der Eindickung des Faeces sterben die meisten Amöben ab, nur ein Teil ist instande Cysten zu bilden. Innerhalb der Cyste spielen sich eigenartige Befruchtungsvorgänge ab, die sich als Autogamie und zugleich als Doppelbefruchtung (wie bei der Conjugation der Ciliaten) erweisen. Die Zelle rundet sich zunächst ab, entledigt sich aller Fremdkörper, worauf im Leben die einzelnen Strukturen (Kern etc.) ungemein deutlich zutage treten, und umgibt sich vorerst mit einer Schleimhülle. Hierauf teilt sich der Kern durch eine Mitose in zwei Tochterkerne (Fig. 4, 7), die auseinanderrücken. Dazwischen entsteht eine linsenförmige Lücke, sodaß gewissermaßen zwei unvollständig geteilte Zellen vorliegen (die Gameten) (Fig. 4, 8). Die Kerne geben hierauf den größten Teil ihrer chromatischen Substanz in Form von Chromidien an das Protoplasma ab, während die Reste als überflüssige somatische Kerne ausgestoßen oder innerhalb der Zelle allmählich resorbiert werden (Fig. 4, 8). Die Chromidien sind generative Chromidien, aus denen nun zwei neue Kerne entstehen, die Geschlechtskerne (Fig. 4, 9). Dieselben bilden auf mitotischem Wege je zwei Reduktionskerne, die wie der somatische Kern entweder ausgestoßen oder resorbiert werden, was von der Bildung der eigentlichen, festen Cystenhülle abhängt, die um diese Zeit zu entstehen pflegt. Nun verschwindet die Lücke im Protoplasma und jeder der beiden reduzierten Kerne teilt sich wiederum mitotisch, wobei sich die beiden Spindeln parallel stellen. Dies kommt dadurch zustande, daß, wie bei der Conjugation der Ciliaten die eine Spindelhälfte als stationärer Kern (weiblich) je in der ursprünglichen Lage verharret, während die zweite Spindelhälfte als Wanderkern (männlich) je während der Teilung auf die andere Seite hinüberwandert, um sich mit dem hier zurückgebliebenen stationären Kern zu vereinigen (Fig. 4, 11 u. 12). Auf diese Weise entstehen zwei Befruchtungskerne oder Syncarien, und wir haben somit wie bei der Conjugation der Ciliaten eine Doppelbefruchtung vor uns. Die Eigentümlichkeit derselben besteht darin, daß es sich zugleich um eine Selbstbefruchtung, eine Autogamie, handelt, indem der ganze Vorgang von einem einzigen Individuum aus seinen Ausgang nimmt.

An die Autogamie schließt sich eine mitotische Kernvermehrung an, bei der es zur Bildung von acht Kernen kommt (Fig. 4, 13). Die

Fig. 4. **Schema des Zeugungskreislaufes von *Entamoeba coli* (Lösch).**
 1—5 Schizogonie der vegetativen Formen, 3 und 4 Kernvermehrung durch multiple Kernteilung, 5 Zerfallteilung. 3a Zweiteilung der vegetativen Formen; 6—12 Autogamie innerhalb der Cyste, 7 erste Kernteilung, 8 darauffolgende unvollständige Zellteilung und Chromidienbildung, 9 Bildung der Gametenkerne aus den Geschlechtschromidien, 10 Bildung je zweier Reduktionskerne, 11 Teilung der reduzierten Gametenkerne in Wanderkern (männl.) und stationären Kern (weibl.), 12 die beiden Syncarien nach Verschmelzung der beiden Wander- und stationären Kerne, 13 und 14 Sporogonie innerhalb der Cyste, 13 Cyste mit 8 Kernen; die durch fortgesetzte Mitose aus den zwei Syncarien hervorgegangen sind, 14 Platzen der Cyste und Freiwerden der 8 jungen durch Sporogonie entstandenen Amöben im Darm eines neuen Wirtes. Original.

acht kernigen Cysten, die sich im abgelagerten Stuhl befinden, sind für unsere Art charakteristisch und kommen bei keinem andern Darmparasiten vor. Sie dienen der Neuinfektion; man kann sowohl Menschen als auch

Katzen damit per os infizieren. Im Anfangsteil des Dickdarms eines neuen Wirtes platzt die Cyste und der Cysteninhalte zerfällt in 8 junge Amöben. Dieser letzte Vermehrungsprozeß, der durch mitotische Kernteilung eingeleitet wird und nach der Befruchtung innerhalb der Cyste vor sich geht, wird als Sporogonie bezeichnet im Gegensatz zu der oben beschriebenen Schizogonie im vegetativen Zustande. Der Zeugungskreis ist hiermit geschlossen.

Entamoeba histolytica (Schaudinn).

Nur in seltenen Fällen wird man bei uns Gelegenheit haben, diese Amöbe zu Gesicht zu bekommen. Sie findet sich nämlich nur in Fällen von ulceröser tropischer Dysenterie, deren Erreger sie ist. Hat man

einen derartigen Fall zur Verfügung, so findet man die Amöben in den glasartigen Schleimflocken der Faeces.

Ihre Größe beträgt 8—60 μ . Im Leben ist sie von der harmlosen *Entamoeba coli* dadurch leicht zu unterscheiden, daß der Körper

Fig. 5. *Entamoeba histolytica* (Schaudinn) aus dem Stuhl eines Ruhrkranken. Dasselbe Individuum nach dem Leben in zwei aufeinanderfolgenden Bewegungsstadien. Das Entoplasma enthält Kern und 3 rote Blutkörperchen. Vergr. 500:1. Nach Jürgens.

auch in der Ruhe eine deutliche Sonderung in Ecto- und Entoplasma aufweist (wie die *buccalis*). Das sehr stark lichtbrechende hyaline Ectoplasma ist zähflüssig glasig und bildet allein die Pseudopodien. Die Bewegung ist dieselbe, wie sie S. 108 für *Entamoeba buccalis* beschrieben wurde. Das Entoplasma ist mit Körnchen, Flüssigkeits- und Nahrungsvacuolen reichlich angefüllt. Die Nahrung besteht aus Bakterien, roten Blutkörperchen und anderen Körperzellen. Eine contractile Vacuole fehlt.

Der Kern ist im Leben schwer zu sehen. Er besitzt im Gegensatz zu *Entamoeba coli* und *buccalis* keine Kernmembran und ist an Chromatin sehr arm. Letzteres bildet eine Schicht von Körnchen an der Peripherie und im Innern des Kernes findet sich ein kleines Binnenkörperchen. Die Lage des Kernes wechselt bei der Bewegung ungemein; er wird vielfach bis an die Grenze des Ectoplasmas verschoben und dabei verzerrt und plattgedrückt.

Die Vermehrung geschieht durch Teilung und Knospung, nie durch Schizogonie in acht Teilstücke, wie bei der *Entamoeba coli*. Bei eintretender Heilung, also wenn die Faeces wieder fester werden, treten Dauerformen auf. Dieselben sind

Fig. 6. *Entamoeba histolytica* (Schaudinn). Nach fixiertem und gefärbtem Präparat. In der Mitte der Kern, unten Blutkörperchen in einer Nahrungsvacuole. Vergr. 1000:1. Original.

sehr klein (3—7 μ) kugelig und schwer auffindbar. Sie haben eine doppeltkonturierte bräunlichgelbe Membran und lassen im Innern keine weitere Struktur erkennen. Sie entstehen als kleine protoplasmatische Knospen an der Oberfläche von Individuen, deren Plasma ganz mit Chromidien erfüllt ist und die meist überhaupt keinen Kern mehr besitzen. Mit diesen kleinen Cysten können Katzen per os infiziert werden.

II. Flagellata.

Allgemeines.

Die typischen Flagellaten sind charakterisiert durch den Besitz einer oder mehrerer Geißeln, das sind lange, fädige Anhänge, die der Bewegung dienen. Die Zahl, Anordnung und Verbindung der Geißeln mit dem Zellkörper bilden Hauptmerkmale für die Systematik dieser Protozoen. Meistens entspringen die Geißeln am Vorderende des Tieres; bei der Bewegung werden sie teils nach vorn gerichtet (Hauptgeißeln und daneben stehende, kleinere, Nebengeißeln genannt), teils nach rückwärts, wobei sie gewissermaßen als Steuerruder dienen und Schleppgeißeln genannt werden. Eine besondere Modifikation ist die undulierende Membran, die dadurch zustande kommt, daß ein sog. Randfaden an der Körperseite entlang zieht, dabei eine dünne Lamelle von Protoplasma herausziehend, um nach vorn oder hinten als freie Geißel zu endigen (näheres hierüber siehe bei den Trypanosomen). Der Randfaden ist zum Verständnis des ganzen Geißelapparates von großer Wichtigkeit. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß die Geißeln nicht einfache Protoplasmafortsätze sind, sondern ähnlich wie die Spermatozoenschwänze Skelettelemente von elastischen Fasern besitzen. Darnach besteht auch eine freie Geißel aus einer axialen oder randständigen Faser und einer feinen Hülle von homogenem, flüssigem Protoplasma. Dieser Bau macht uns auch die Bewegungsweise der Geißeln verständlich. Das nackte Protoplasma ist wie bei der Amöbenbewegung durch Änderung der Oberflächenspannung das tätige, kontraktile Element. Dadurch, daß dasselbe mit einem elastischen Faden in fester Verbindung steht, wird die sonst ungeordnete Bewegung in eine geordnete, typische Bewegung verwandelt.

Morphologisch und systematisch wichtig ist neben der Zahl und Anordnung vor allem die Art der Inserierung der Geißeln, die nach neueren Untersuchungen durch einen besonderen Basalapparat mit dem Körper in Verbindung stehen: entweder entspringen sie direkt aus einem besonderen kleineren Kern, dem Blepharoplasten, oder sie nehmen ihren Ursprung von einfachen oder doppelten Basalkörpern (letztere Diplosom genannt), das sind kleine, stark färbbare Körperchen. Diese stehen wiederum durch eine einfache oder doppelte Fibrille, dem sog. Rhizoplasten, mit dem Kern, speziell dem Caryosom, in Verbindung. Physiologisch dienen diese für die Systematik wichtigen Differenzierungen, die Blepharoplaste, Basalkörper und Rhizoplasten, der Geißel als Ver-

ankerung mit dem Kern und bilden somit ein weiteres Element zum Zustandekommen der geordneten Bewegung.

Der Körper der Flagellaten ist meist länglich und mehr oder weniger formbeständig. Nur die niederen Formen besitzen noch neben der Geißel, eine amöboide Bewegung, oder sind metabol. Die konstante Form kann bedingt sein durch die sog. Pellicula, eine cuticulare Verdickung der äußeren Alveolenreihe, oder den Periplast, gleichfalls eine Art Oberflächenhaut, der elastische Fasern eingebettet sind.

Im darunterliegenden Protoplasma findet sich häufig ein deutlicher Alveolarsaum ausgebildet. Eine Differenzierung in Ecto- und Entoplasma fehlt häufig. Als besondere Organelle ist meist ein Zellmund oder Cytostom und eine oder mehrere contractile Vacuolen vorhanden. Das Plasma ist oft stark granuliert und kann Einschlüsse verschiedenster Art enthalten. Die Kerne sind sehr verschieden ausgebildet und verhalten sich auch bei der Kernteilung sehr mannigfach.

Die gewöhnliche Art der Fortpflanzung ist die Längsteilung im frei beweglichen Zustand. Sehr verbreitet ist auch die ein- oder mehrmalige Längsteilung innerhalb einer Cyste. Der Kernteilung pflegt die Teilung des Basalkörperapparates voranzugehen. Die Hälfte der Geißeln wird in der Regel neu gebildet. Durch rasch aufeinanderfolgende Teilungen der Kerne und unvollständige Zellteilung kann eine multiple Fortpflanzung zustande kommen. Als Befruchtungsvorgang findet sich Isogamie sowohl von gewöhnlichen erwachsenen Formen als auch von besonderen kleinen Geschlechtsformen. In gleicher Ausbildung kommen die verschiedensten Formen der Anisogamie bis zur ausgesprochenen Oogamie vor. Auch autogame Befruchtungsvorgänge sind bei den Flagellaten nicht selten. Aus diesen kurzen Andeutungen über die Fortpflanzungs- und Befruchtungsvorgänge der Flagellaten ist ersichtlich, daß der ganze Entwicklungskreis der einzelnen Formen ungemein verschieden sein kann, da die Möglichkeit zu den verschiedensten Kombinationen gegeben ist.

a) Protomonadina und Polymastigina.

Allgemeines.

Zu den Protomonadinen gehören die primitivsten Formen der Flagellaten. Ihr Körper ist mehr oder minder metabol, ja selbst amöboid beweglich. Sie besitzen eine oder zwei Geißeln, die gleich oder verschieden lang sein können und durch Basalkörper und Rhizoplasten mit dem Kern in Verbindung stehen. Von parasitischen Formen gehören hierher Vertreter der Gattungen *Bodo* und *Cercomonas*, meist Darmbewohner. Einen Vertreter der ersten Gattung werden wir im speziellen Kurs eingehend kennen lernen.

Die Polymastigina weisen sehr mannigfaltige Formen auf, die 4—8 Geißeln besitzen, welche wiederum von verschiedener Größe sein können, aber wie bei den Protomonadinen durch Basalkörper und Rhizoplasten mit dem Kern verbunden sind. Mehrere Gattungen und Arten kommen auch beim Menschen vor. Von der wichtigsten Gattung, *Trichomonas*, werden wir ebenfalls einen Vertreter kennen lernen. Bezüglich des Banes, der Fortpflanzung usw. sei daher auf den speziellen Kurs verwiesen.

Technische Bemerkungen.

Material. Der Enddarm und die Kloake unserer Eidechsen beherbergen fast stets drei Arten von Flagellaten, *Bodo lacertae* (Grassi), eine Protomonadine, *Trichomastix lacertae* (Bütschli) und *Trichomonas lacertae* (v. Prowazek), zwei Polymastiginen. Die letztgenannte ist die seltenste, während die beiden ersten stets reichlich zu finden sind. Da sich diese Formen im frischen Präparat stunden- ja tagelang lebend erhalten, da außerdem der Lebenszyklus jeder einzelnen bekannt ist und daher alle Entwicklungsstadien bestimmt werden können, so eignen sie sich in besonderem Maße zur Einführung in das Studium der Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Flagellaten.

Zur Herstellung von Präparaten preßt man durch leichten Druck etwas Kot aus dem After der Eidechse, fängt ihn in gut gereinigten Uherschälchen auf und fertigt hiervon unter ev. Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung und dünnflüssiger Gelatinelösung (zur Herabsetzung der starken Beweglichkeit der Flagellaten) hängende Tropfen oder einfache Deckglaspräparate (s. S. 105).

Zu Dauerpräparaten fixiert man dünne Deckglasausstriche in Sublimatalkohol und färbt mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain; auch die bequeme Eisenchlorid-Hämatoxylinmethode ist hierzu anwendbar. (Näheres siehe bei den Amöben S. 106.)

Spezieller Kurs.

Bodo lacertae (Grassi).

Diese Protomonadine ist stets zu finden. Sie besitzt lanzett- oder keilförmige Gestalt; der hintere Teil des Körpers ist, vom ersten Drittel angefangen, meist von rechts nach links zu einer halben oder selbst ganzen Spirale gedreht, ähnlich der Spitze eines Bohrers (Fig. 7a).

Sie besitzt den für die Gattung *Bodo* charakteristischen Geißelapparat, nämlich zwei gleich dicke verschieden lange Geißeln am Vorderende, wovon die längere fast immer nach vorn gerichtet ist, während die zweite als Schleppgeißel funktioniert. Beide Geißeln, die auch im Leben gut zu sehen sind, nehmen ihren Ursprung von einem Basalapparat, der erst in mit Eisenhämatoxylin gefärbten Präparaten deutlich zu sehen ist. Er stellt ein aus zwei Anschwellungen bestehendes Kerngebilde dar, von dem, durch eine schmale Schicht homogenen Plasmas getrennt, eine mit einer Anschwellung beginnende, sich stark färbende Fibrille (Rhizoplast) seitlich zum Kern zieht. Wie man an gequetschten Exemplaren sehen kann, durchbricht die Fibrille den Kern, um am Ende desselben im Caryosom zu enden (Fig. 6b u. c).

Die Bewegung ist sehr charakteristisch; die Tiere schwimmen rasch, unruhig umher, mit der vorderen Geißel gleichsam tastend; der Körper kann dabei auch eine geringe Beweglichkeit aufweisen.

Nach dem Bau der Kerne kann man zwei Typen unterscheiden, erstens Individuen mit einem typischen, bläschenförmigen Nucleus, wie er bei Flagellaten am häufigsten ist. Derselbe ist rund, besitzt eine deutliche

Kernmembran, der grobe Chromatinbrocken anlagern. Außerdem kann man an Eisenhämatoxylinpräparaten ein achromatisches Wabenwerk

Fig. 7. **Bodo lacertae** (Grassi).
a nach dem Leben, *b* Typus ohne, *c* Typus mit Chromidium. Vergr. 1000:1. Nach v. Prowazek.

und ein kompaktes Caryosom beobachten, das meist exzentrisch gelagert ist. Im Leben erscheint der Kern als ein grünlich schimmerndes, lichtbrechendes Bläschen (Fig. 7*a*).

Der zweite Typus, der eine gedrungene Gestalt aufweist (Fig. 7*c*), hat einen ähnlichen, aber mehr kompakten Kern. Hinter demselben jedoch noch einen weiteren, im Leben grünlich schimmernden kernartigen Körper. Letzterer kann sehr verschiedenartig gestaltet sein, wurst-sichelbandförmig, geweihartig verzweigt, oder in mehrere längliche oder ovale Körper zerteilt. Mit Eisenhämatoxylin färbt er sich gut (Fig. 7*c*).

Wie aus den analogen Verhältnissen bei der Autogamie hervorgeht, handelt es sich hier um ein Geschlechtschromidium.

Am Protoplasma kann man in Eisenhämatoxylinpräparaten gut die feinwabige Struktur beobachten. Außerdem findet man vielfach größere sich intensiv färbende Granula. Ein Zellmund (Cytostom) fehlt; die Ernährung erfolgt auf osmotischem Wege.

Da die Fortpflanzungsstadien seltener zu beobachten sind, so sollen dieselben hier nur ganz kurz geschildert werden. Die beiden durch ihre Kernverhältnisse gekennzeichneten Typen verhalten sich dabei verschieden. Die gewöhnliche (indifferente Form) bildet kugelige Vermehrungscysten, wobei der ganze Geißelapparat rückgebildet und eine zarte, gallertige Cystenmembran ausgeschieden wird. Auf die feineren Vorgänge bei der Teilung des Kernes, der sich dabei zunächst vergrößert und auch im Leben deutlich sichtbar wird, wollen wir hier nicht näher eingehen; es sei nur bemerkt, daß der ganze Vorgang auch im Leben deutlich zu beobachten ist und sich in etwa 20 Minuten abspielt. Nach einmaliger (in seltenen Fällen zweimaliger) Teilung der Zelle bilden die beiden (resp. 4) Kindindividuen noch innerhalb der Cyste ihren Geißelapparat, bewegen sich lebhaft und schlüpfen dann nacheinander durch eine Perforation der Membran ans.

Die durch das gametoide Chromidium ausgezeichnete zweite Form vermehrt sich dagegen im freibeweglichen Zustande durch Längsteilung. Der Teilung des ganzen Tieres geht eine Teilung des Basalapparates, eine mitotische Teilung des Hauptkernes, sowie eine mehr amitotische des

Chromidiums voraus, wovon ev. Stadien an Eisenhämatoxylinpräparaten zur Beobachtung gelangen können.

Bei dieser Art können auch sehr leicht Befruchtungsvorgänge studiert werden: dieselben spielen sich in einer Cyste ab und stellen eine typische Autogamie dar. Wegen der starken Lichtbrechung der Befruchtungseysten läßt sich in vivo nicht viel beobachten. Man muß sich daher auf die Untersuchung von Eisenhämatoxylinpräparaten beschränken. Die Bilder reihen sich folgendermaßen aneinander: zunächst sieht man in dem sehr deutlich alveolär gebanten Protoplasma den vergrößerten Kern und an dessen Peripherie eine Anzahl dunkler färbbarer Bläschen liegen, die offenbar aus dem Kern ausgetreten sind und vermutlich dem Chromidium der zweiten freien Form entsprechen (Fig. 8a). Diese chromidialen Bläschen verschmelzen zu einem neuen Kern, dem Geschlechtskern (Fig. 8. b und c), während der ursprüngliche als rein somatischer Kern

Fig. 8. *Bodo lacertae* (Grassi).

Autogamie innerhalb der Cyste, a Austreten der Geschlechtschromidien aus dem Kern in Form von Bläschen, b und c Zusammenfließen der Bläschen und Abrundung zum Geschlechtskern, d und e Teilung in 2 Gametenkerne, f und g Bildung je zweier Reduktionskerne, die wie der somatische Kern resorbiert werden, h und i Copulation der reduzierten Kerne zum Syncarion. Nach fixierten und gefärbten Präparaten. Vergr. 1000:1. Nach v. Prowazek.

degeneriert und allmählich resorbiert wird. Der neue Kern teilt sich hierauf durch eine Amitose in zwei Tochterkerne (Fig. 8. d und e), die nach Abschneürung von zwei weiteren Kernen, die als Reduktionskerne aufzufassen sind und gleichfalls degenerieren (Fig. 8. f und g), sich vergrößern und nun erst als die eigentlichen Befruchtungskerne miteinander zu dem Syncarion verschmelzen. (Fig. 8. h und i.) Nach der Befruchtung kann direkt im gleichen Wirt wieder das freie Flagellat aus der Cyste hervorgehen oder aber die Cyste wird zu einer Dauercyste und dient der Neuinfektion.

Außer dieser Autogamie in einer Cyste, die an die Verhältnisse der *Entamoeba coli* erinnert, kann noch (allerdings äußerst selten) eine Anisogamie, eine Copulation zweier, durch ihre Größe etwas verschiedener, beweglicher Individuen stattfinden, die gleichfalls mit einer Cyste abschließt. Derselben folgt innerhalb der Cyste eine Teilung in 2—16 junge Flagellaten.

Trichomastix lacertae (Bütschli).

Die Gestalt dieser Art, die ebenso zahlreich vorkommt, ist gestreckt, birn- oder rübenförmig. Manchmal zieht sich der Protoplast etwas zusammen, wobei dann am Hinterende eine Spitze hervorragt. Diese spitze Form wird bedingt durch einen elastischen Stab, den sog. Achsenstab, der als allmählich von vorn nach hinten sich verjüngende Linie den ganzen Körper durchzieht und mit Eisenhämatoxylin schwarz gefärbt erscheint (Fig. 9).

Fig. 9. **Trichomastix lacertae** (Bütschli).
Vergr. 1000:1.
Nach v. Prowazek.

Dieser Achsenstab bildet zusammen mit dem Geißelapparat das Hauptcharakteristikum unserer Art. Letzterer besteht aus 4 Geißeln und 2 Basalkörpern, die vor dem Achsenstab liegen und durch eine Zone homogenen Protoplasmas voneinander getrennt sind. Im Leben sind die Basalkörper kaum sichtbar, mit Eisenhämatoxylin färben sie sich schwarz. Von den vorderen entspringen drei gleich lange (ca. 10 μ) Geißeln, die nach vorn gerichtet sind, an dem hinteren ist die sehr lange (ca. 24 μ) nach hinten gerichtete Schleppgeißel inseriert. An der letzteren kann man eine für das Verständnis der Geißelbewegung wichtigen Bau bei starker Vergrößerung (Immersion 2 mm. Kompensationsocular 12) erkennen; sie läuft nämlich am Ende in einen deutlich abgesetzten Endfaden aus, der als elastische Axialfibrille zu deuten ist, die im übrigen Teil der Geißel von einer spiraligverlaufenden protoplasmatischen Hülle umgeben ist.

Die 3 Vordergeißeln schlagen meist peitschenartig, woraus sich die charakteristische wackelnde pendelnde Bewegung ergibt.

Am Vorderende des Achsenstabes, demselben seitlich angeheftet, liegt der ovale Kern; er besitzt eine deutliche Kernmembran und feinwabige Struktur, in deren Knotenpunkten Chromatinkörner liegen.

An dem Protoplasma kann man gleichfalls einen feinwabigen Bau erkennen. An günstigen Präparaten ist auch noch eine spaltförmige Einbuchtung am Vorderende wahrzunehmen, der Zellmund oder das Cytostom, das der Nahrungsaufnahme dient. Die Nahrung besteht aus Coccen, die sich vom Grunde des Cytostoms ablösen und in eine Nahrungsvacuole im Protoplasma eingeschlossen werden.

Die Fortpflanzung ist, wie in der Regel bei Flagellaten, eine Längsteilung. Dabei teilt sich der Basalapparat und ein Teil der Geißeln wird auf die Kindindividuen übernommen, die übrigen werden neu gebildet. Am auffallendsten bei der Teilung ist das Verhalten des Achsenstabes, der sich zunächst verkürzt, dann senkrecht zu seiner ursprünglichen Lage streckt und als dunkelfärbbares Querstäbchen den Kern und die Zelle gleichsam zerstemmt. An gefärbten Präparaten können ev. Stadien dieses Vorganges beobachtet werden.

Bei dieser Art findet sich ein ähnlicher autogamer Befruchtungsvorgang innerhalb der Cyste, wie wir ihn bei der Besprechung der *Bodo lacertae* kennen gelernt haben. Von den Befruchtungscysten von *Bodo* unterscheiden sich die von *Trichomastix* neben den feineren Vorgängen am Kern, auf die wir hier nicht näher eingehen wollen, einmal durch ihre Durchsichtigkeit, was das Erkennen der Kernverhältnisse auch

im Leben ermöglicht, und dann durch das Vorhandensein eines großen kugeligen oder ovalen Körpers von glykogenartiger Substanz im Protoplasma.

Trichomonas lacertae (v. Prowazek).

Die *Trichomonas* ist die seltenste unter den drei Flagellaten des Eidechsendarmes. Größe und Form ist sehr variabel, letztere in der Regel oval oder mandelförmig. Als Angehörige der Gattung *Trichomonas* besitzt unsere Form drei mittellange, im Leben etwas grünlich schimmernde und an der Basis miteinander verklebende Geißeln (Fig. 10a), die von einem fast vierkantigen, mit Eisenhämatoxylin stark färbbaren Basalkorn entspringen (Fig. 10b). Die Verbindungsfibrille zwischen diesem und dem Kern ist nur selten zu erkennen. Das weitere Charakteristikum der Gattung bildet die undulierende Membran, deren Randfaden gleichfalls von dem Basalkorn entspringt und im letzten Körperdrittel als freie Geißel ausläuft. Der Randfaden entspricht der Schleppgeißel von *Trichomastix*, die hier zum größten Teil mit dem Körper in Verbindung bleibt und so zur Bildung der undulierenden Membran führt. Der undulierende Plasma-saum erhält noch eine Stütze durch eine im Zellkörper verlaufende Fibrillenleiste, der sie gewissermaßen aufsitzt. Ihr kann eine Reihe runder, stark färbbarer Körner unbekannter Bedeutung angelagert sein. Ein Achsenstab ist schwach entwickelt und nur schwer nachweisbar (Fig. 10b).

Fig. 10. **Trichomonas lacertae** (v. Prowazek).

a nach dem Leben, b nach fixiertem und gefärbtem Präparat. Vergr. 1000:1.
Nach v. Prowazek.

Am Vorderende befindet sich seitlich von den Geißeln ein schmales, aber sehr tiefes, sichelförmiges Cytostom (Fig. 10a links neben dem Kern).

Der ovale und seitlich etwas abgeplattete Kern ist auch am lebenden Objekt gut zu sehen (Fig. 10a) und bietet nichts besonderes dar. Die Fortpflanzung vollzieht sich ähnlich wie bei *Trichomastix*, außerdem kommt auch noch eine multiple Vermehrung vor. Da diese Art sehr selten zu finden ist, brauchen wir auf die Einzelheiten hier nicht einzugehen.

b) **Binucleata.**

Allgemeines.

Als Binucleata fassen wir eine Gruppe von niederstehenden, mit gewissen Protomonadinen nahe verwandten Flagellaten zusammen, die mit einer oder zwei Geißeln ausgestattet sind, wovon eine meist den ganzen Körper entlang zieht, den Randsaum einer undulierenden Membran bildend. Das Hauptcharakteristikum der Ordnung besteht jedoch in der Art der Inserierung der einen resp. der beiden Geißeln, die im Gegensatz zu verwandten Protomonadinen stets mit einem besonderen

lokomotorischen Kern, dem Blepharoplasten, in Verbindung stehen (mit oder ohne Rhizoplasten und Basalkörpern). Der Blepharoplast ist in der Regel kleiner als der eigentliche Hauptkern oder vegetative Kern.

Die hierher gehörigen Formen bilden auch biologisch eine einheitliche Gruppe, indem sie fast sämtlich in Wirbeltieren schmarotzende Blutparasiten mit Generations- und Wirtswechsel sind, wobei die zweite Generation in blutsaugenden Tieren (Insekten, Zecken, Blutegel) leben. Nur wenige Formen haben keinen Wirtswechsel und sind dann entweder ausschließliche Parasiten der Insekten oder Blutparasiten der Wirbeltiere. Durch neuere entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß auch die epi- und endoglobulären Blutparasiten, die bisher als Haemosporidia eine besondere Ordnung der Sporozoen gebildet haben, hierher gehören. Sie haben zwar in Anpassung an die intracelluläre Lebensweise den Flagellatencharakter größtenteils eingebüßt, zeigen ihm jedoch noch in gewissen Entwicklungsstadien und weisen vor allem das hervorstechendste Merkmal der Binnucleata, den lokomotorischen Kern oder Blepharoplasten, mehr oder minder deutlich während der ganzen Entwicklung auf.

Die Gestalt der Flagellatenformen der Binnucleaten ist meist länglich, sichelförmig. Die wichtigsten formgebenden und die Bewegung bestimmenden Elemente (Centralfasern, Randfaden der undulierenden Membran und Periplastfasern) werden wir im speziellen Kurs an *Trypanosoma lewisi* und *Haemoproteus noctuae* näher kennen lernen. Unter dem Periplast, der oberflächlichen durch Längsfasern gefestigten Protoplasma-Haut findet sich das alveolär gebaute Protoplasma, bei dem eine Trennung in Ecto- und Entoplasma fehlt. Der Hauptkern ist meist bläschenförmig. Bei der Teilung lassen sich acht Chromosome und ein Centrankorn nachweisen. Der lokomotorische Kern erscheint meist einheitlich intensiv gefärbt (mehr violett bei Giemsa-färbung infolge des stärkeren Plastingehaltes); seine Kernatur (Chromosome und Centrankorn) ist nur selten nachweisbar.

Die Fortpflanzung ist entweder eine Längsteilung oder eine multiple Vermehrung, die auf fortgesetzte Längsteilung zurückzuführen ist. Besonders bei den Hämosporidien finden sich verschiedene Grade der Ausbildung der multiplen Vermehrung (Schizogonie), wohl die Folge der endoglobulären Lebensweise. Die Befruchtung ist stets eine Anisogamie, jedoch bei den freien Spermformen (Trypanosomen etc.) weniger extrem ausgebildet als bei den meist völlig oogamen Hämosporidien. Im Darm des zweiten Wirtes pflegt die Befruchtung vor sich zu gehen. Darauf folgt in allen, bis jetzt bekannten Fällen ein geißellooses, gregarimenähnliches, bewegliches Stadium, der sog. Ookinet. Dieser kann sich bisweilen, wohl mehr in Anpassung an die Lebensbedingungen im zweiten Wirt als infolge der Befruchtung durch eine besondere multiple Vermehrung, die sog. Sporogonie, fortpflanzen. Durch den Stich oder Biß des infizierten blutsaugenden Tieres erfolgt eine Neuinfektion des Wirbeltieres.

Der ganze Entwicklungskreis ist bei den einzelnen Gattungen der Binnucleaten durch geringere oder stärkere Ausbildung der Anisogamie und Ausbildung verschiedener multipler Teilungsvorgänge (Schizogonie und Sporogonie) zwar ein sehr verschiedener, doch läßt sich die Ausbildung der Oogamie einerseits, die verschiedene multiple Vermehrungsweise andererseits Schritt für Schritt bei den einzelnen Formen verfolgen

und es ergeben sich so aus dem Vergleich der ganzen Entwicklungszyklen phylogenetische Reihen, die klar die nahen Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Gattungen erweisen.

Die Binnucleata enthalten eine große Anzahl für Menschen und Tiere pathogener Gattungen und Arten. Die wichtigsten darunter gehören den Gattungen *Trypanosoma*, *Babesia* und *Plasmodium* an. Theoretisch von Bedeutung sind die Gattungen *Haemoproteus* und *Herpelomonas*.

Technische Bemerkungen.

Material: Zu diesem Kurs brauchen wir mit *Trypanosoma lewisi* (ev. auch *brucei*) infizierte Ratten, Eulen mit *Haemoproteus* und babesia-krankte Hunde; womöglich verschaffe man sich auch Deckglasausstriche von menschlichen Malariaparasiten.

Infizierte graue Ratten finden sich vielfach in der Natur. Am einfachsten ist es, einen einmal gefundenen Stamm stets auf weiße Ratten überzupfen. Man entnimmt der chloroformierten Ratte das Blut mit der Pravazschen Spritze direkt aus dem Herzen, mischt es mit wenig physiologischer Kochsalzlösung und spritzt uninfizierten weißen Ratten 3—5 cem subkutan oder intraperitoneal ein. Die Dauer der künstlichen Infektion schwankt bei grauen und weißen Ratten zwischen 3 Wochen und 6 Monaten. In der Regel werden keine Krankheitserscheinungen beobachtet. Auch in künstlichen Kulturen (näheres siehe weiter unten) kann man *Trypanosoma lewisi* weiter züchten und später wieder auf eine Ratte überimpfen.

Als Vertreter der endoglobulären Hämosporidien untersuchen wir *Haemoproteus noctuac*, einen Parasiten des Steinkauzes, der zugleich theoretisch von größter Bedeutung ist. Die meisten eingefangenen Steinkäuze finden sich infiziert, man kann sich dieses Material daher leicht verschaffen. Auch von diesem Parasiten gelingen künstliche Kulturen, dagegen ist die Überimpfung von Vogel zu Vogel, sowie eine Rückimpfung aus der Kultur mit den größten Schwierigkeiten verknüpft.

Zum Studium der Babesien ist die beim Hunde vorkommende Form am geeignetsten; sie läßt sich leicht von Hund auf Hund übertragen. Impfung ähnlich wie bei *Trypanosoma* subkutan, aber mit großen Mengen (etwa 15—20 cem).

Ferner brauchen wir den zweiten Wirt des jeweiligen Parasiten, das ist für *Trypanosoma lewisi* die Rattenlaus *Haematopinus*, die sich immer auf grauen Ratten findet, für *Haemoproteus Culex pipiens*, die gemeine Stechmücke, und für *Plasmodium Anopheles*, eine ebenfalls bei uns vorkommende Mücke. Die Zecke *Haemophysalis*, die vermutlich Überträgerin der Hundebabesia kommt bei uns nicht vor und ist schwer zu beschaffen.

Zur Herstellung von Präparaten entnimmt man das Blut bei der Ratte an der Schwanzspitze, beim Steinkauz an der Armschwinge und beim Hunde am Ohrfläppchen. Die Lebenduntersuchung geschieht entweder im hängenden Tropfen, den man mit physiologischer Kochsalzlösung etwas verdünnen kann oder (besser) man bringt einen Tropfen Blut auf einen Objektträger, legt leicht und ohne Druck ein Deckglas auf und umrandet sofort mit Vaseline oder Wachs. Für Dauerpräparate macht man dünne Ausstriche auf Deckgläser oder Objektträger. Man entnimmt mit der Kante eines Deckgläschens (oder geschliffenen Objektträgers) ein Tröpfchen Blut, setzt die Kante auf ein zweites Deckglas

(Objektträger) auf, damit sich der Tropfen längs der Kante ausbreite und fahre dann, die ausgebreitete Blutschicht hinter dem Deckglas herziehend (nicht vor ihm herschiebend) über das zweite Deckglas hin.

Die Blutparasiten sind so ziemlich die einzigen Protozoen, die ein Antrocknen vertragen. Zur Fixierung bringt man am zweckmäßigsten die luftgetrocknenen Ausstriche auf 10—30 Min. in 95 % oder absoluten Alkohol. Vor dem Trockenwerden kann man die Ausstriche auch 5—10 Sek. in Osmiumdämpfen fixieren, wodurch die Bewegungsformen besser erhalten bleiben.

Die einfachste und beste Färbung für alle Blutparasiten ist die Färbung nach Giemsa. Man verdünne die käufliche Lösung in der Weise, daß man zu 1 cem destillierten Wassers 1 Tropfen Farblösung zusetzt (nicht mehr). Die Verdünnung muß unter mäßigem Schütteln in weitem, reinem Gefäß geschehen und die Farbe ist hierauf sofort zu verwenden. In der Regel genügt eine Färbedauer von 15—20 Min. Hierauf spült man mit starkem Wasserstrahl ab, trocknet ab und bettet in Zedernöl ein. Bei einer gelungenen Färbung muß das Plasma der Parasiten blau, die Kerne und der lokomotorische Apparat rot, die Erythrocyten gelbrot sein (vergl. Fig. 11). In den weitaus meisten Fällen genügen diese Methoden, nur für besonders große, wasserreiche Formen (z. B. *Trypanosoma theileri*) und für feinere Details muß man zur feuchten Fixierung (Sublimatalkohol oder Hermannsche Flüssigkeit) und Eisenhämatoxylin- oder Delafieldsche Hämatoxylin-Färbung greifen. (Anwend. s. S. 101.) Am besten fixiert man hierbei eine große Blutmenge, indem man sie direkt in die Fixierungsflüssigkeit tropfen läßt. Nun zentrifugiert man sofort, hebt die Fixierungsflüssigkeit ab, wäscht aus, färbt, führt durch die Alkoholstufen (nach jeder Prozedur stets wieder zentrifugierend) und bettet in Zedernöl ein.

Kultur. *Trypanosoma lewisi* und *Haemoproteus noctuae* lassen sich auch auf künstlichen Nährböden züchten und zwar im Condenswasser von Kaninchenblutagar. Man setzt das defibrinierte Kaninchenblut zu gleichen Teilen den bei 50° gehaltenen, verflüssigten Agarröhrchen direkt zu und legt sie schräg hin. Die erstarrten Röhrchen werden mit Gummikappen versehen und auf 24 Stunden in 37° gebracht, wo sich reichlich Condenswasser bildet und nicht sterile Röhrchen erkennbar werden.

Zur Impfung entnimmt man das Blut der chloroformierten Ratte (resp. Steinkauz) mit der Pravazschen Spritze direkt aus dem Herzen und mischt es mit wenig Kochsalzlösung. Die Röhrchen werden hierauf mit 3 Ösen resp. 3 Tropfen aus steriler Pipette geimpft. Nach etwa 3 Tagen zeigen sich in den Kulturen Rosetten von Flagellaten, die sich rasch vermehren. Die Kulturen sind meist etwa einen Monat lang infektiösfähig.

Spezieller Kurs.

Trypanosoma lewisi (Kent).

Trypanosoma lewisi findet sich im Blut einer infizierten Ratte besonders am Anfang der Infektion in großer Menge und ist im Leben, wie im gefärbten Präparat leicht zu erkennen. Aussehen und Größe sind sehr variabel zu verschiedenen Zeiten. Die Größe kann zwischen 7—30 μ schwanken. Die Breite des abgeplatteten Körpers beträgt 1.5 bis 3 μ . Die Gestalt ist im allgemeinen lanzettlich und nach einer

Seite ausgebogen. Das Hinterende ist bei unserer Form im Gegensatz zu *Trypanosoma brucei* und anderen Arten meist schnabelförmig zugespitzt (Fig. 11).

Auf der konvexen Seite verläuft die undulierende Membran, deren nach Giemsa sich rotfärbender Randfaden von dem im hinteren Körperende liegenden Blepharoplasten oder lokomotorischen Kern entspringt und sich nach vorn in die freie Geißel fortsetzt. Dieser Geißelapparat, eine Geißel am Vorderende, die zugleich den Randfaden einer undulierenden Membran bildet, sowie die Doppelkernigkeit, ein Hauptkern und ein lokomotorischer Kern, von welch letzterem aus der Geißelapparat entspringt, bilden das Hauptkriterium der Gattung *Trypanosoma*. Dazu kommen noch weitere fibrilläre Differenzierungen, die aber sehr schwer und z. T. nur in gewissen Entwicklungsstadien (nach der Befruchtung) nachzuweisen sind. Es sind dies zwei Centrifasern, die im Innern durch die ganze Zelle sich erstrecken (Fig. 16 c) und vor allem acht Periplastfasern (sog. Myoplaue), je vier auf jeder Seite des abgeplatteten Körpers, die gleichfalls vom Blepharoplasten ausgehen und als eine Art Fibrillenmantel den Körper der ganzen Länge nach umziehen. (Näheres hierüber bei *Haemoproctus*.) Der Randfaden der undulierenden Membran, resp. die Geißel

färbt sich nach Giemsa wie die chromatische Substanz des Kernes intensiv rot, ebenso die Periplastfasern, falls sie überhaupt darstellbar sind und die Centrifasern. Es handelt sich bei diesen Bildungen um Kernderivate, wie wir später noch sehen werden. Die Periplastfasern liegen eingebettet in die oberflächliche verdickte Plasmahaut, mit der sie den sog. Periplast bilden. Dieser färbt sich (allerdings nur bei längerer Färbedauer) gleichfalls nach Giemsa

Fig. 11. **Trypanosoma lewisi** (Kent).
Übersichtsbild aus infizierter Ratte. Färbung nach Giemsa.
Rechts oben Lymphocyt. Vergr. 1200:1. Original.

rot (Fig. 16 b und c und Fig. 19). Der Randfaden der undulierenden Membran, sowie die Periplastfasern (und Centrifasern) sind die formbestimmenden Elemente des Trypanosomenkörpers, dessen typische Bewegung sie ebenfalls bedingen. Wir unterscheiden zweierlei Arten von Bewegungen, einmal metabolische Körperkontraktionen, die durch die Periplastfasern bestimmt gerichtet werden, andererseits die Wellenbewegung der undulierenden Membran, die in der Nähe der Geißelwurzel beginnt und nach vorn in die Geißelbewegung ausklingt.

Das Protoplasma erscheint im Leben leicht grünlich, im Giemsa-
präparat blau oder leicht violett (Fig. 11). Eine Differenzierung in Ecto-
und Entoplasma fehlt. Es ist fein alveolär gebaut und enthält in den
Wabenwänden feine Granulationen oder undeutliche Verdichtungen. Häufig
findet sich eine oder mehrere Vacuolen (Nahrungsvacuole).

Der Hauptkern liegt bei unserer Form im Gegensatz zu *Trypano-
soma brucei* und *gambiense* an der Grenze des ersten und zweiten
Körperdrittels (Fig. 11). Er ist oval und am lebenden Tiere als helle
Stelle erkennbar. Im gefärbten Präparat findet sich in den Wänden eines

Fig. 12. **Trypanosoma lewisi** (Kent).

a Längsteilung, *b—e* verschiedene Stadien der multiplen Teilung. Nach Laveran
und Mesnil aus: Doflein und v. Prowazek.

deutlich alveolär gebauten Liningerüstes, das bald staubartig verteilte,
bald zu größeren Körnern oder (hauptsächlich vor der Teilung) zu acht
Chromosomen zusammengeballte, rote Chromatin. Außerdem kann
man an günstigen Präparaten noch ein mehr violett gefärbtes Caryosom
unterscheiden.

Der lokomotorische Kern oder Blepharoplast liegt seitlich
an dem Ursprung des Randfadens durch eine homogene Plasmaschicht
von letzterem getrennt. Im Leben erscheint er als grünlich schim-
merndes glänzendes Korn, im Giemsa-Präparat ist er einheitlich gefärbt,
aber mehr blaurot als der Kern (Fig. 11, 14). Eine besondere Struktur

läßt sich nur durch Maceration und in wenigen Entwicklungsstadien (Reduktionsteilung, Fig. 14 *b*) nachweisen. Charakteristisch für *Trypanosoma lewisi* im Gegensatz zu anderen Arten ist die längliche Form des Blepharoplasten, sowie seine meist etwas windschiefe Stellung in der Zelle (Fig. 11, 14).

Die Vermehrung der Trypanosomen im Rattenblut ist eine doppelte, einmal eine Längsteilung und dann eine multiple Teilung. Erstere findet im peripheren Blut statt. Dabei teilt sich zunächst der Blepharoplast und der Hauptkern und zwar in der Regel ersterer zuerst (Fig. 12 *a*). (Doch können sich beide Kerne auch zugleich teilen oder der Hauptkern in der Teilung voranschreiten.) Bei der Teilung des Hauptkernes zerschnürt sich das Caryosom und bildet eine Centralspindel, wodurch der Kern in unregelmäßiger Weise — die acht Chromosome haben sich zuvor schon geteilt und sind auseinander gerückt — gewissermaßen zerstemmt wird (siehe Fig. 19 von *Trypanosoma brucei*). Der Blepharoplast schnürt sich gleichfalls durch und in der Bahn der alten Geißel, die von dem einen Teilindividuum übernommen wird, bildet sich eine zweite neue Geißel (Fig. 12 *a* und 19 *b*). Die Geißeln rücken auf die gegenüberliegenden Seiten und die Zelle teilt sich nur der Länge nach am Vorderende beginnend (Fig. 12).

Bei dem zweiten Vermehrungsvorgang, der mehr zu Anfang der Infektion in den inneren Organen vor sich geht, rückt der Blepharoplast in der Regel vor den Kern und durch fortgesetzte Kernteilungen und entsprechende Neubildung von Geißelnebstehen Rosetten- oder Sternfiguren, bei denen erst nachträglich die Zellteilung erfolgt (Fig. 12 *b—d*). Es finden sich jedoch die verschiedenen Übergänge von einer einfachen Längsteilung bis zur eben beschriebenen multiplen

Teilung. Die verschiedenen Stadien der Vermehrung kann man leicht im lebenden wie im gefärbten Präparat zu Gesicht bekommen.

Schon im Rattenkörper tritt das *Trypanosoma lewisi* in mannigfachen Formen auf, die teils durch die äußeren Lebensbedingungen (längere oder kürzere Infektion etc.), teils durch geschlechtliche Unterschiede (indifferente, weibliche und männliche Formen) bedingt sind. An manchen dieser Formen können sich auch noch komplizierte Prozesse am Kern abspielen (Parthenogenese etc.). Da die Bedeutung dieser Formen und die sich an ihnen abspielenden Vorgänge hier nicht so klar liegen wie bei dem später zu behandelnden Vogelparasiten *Haemoproteus*, so wollen wir hier nicht näher darauf eingehen.

Die weitere Entwicklung des *Trypanosoma lewisi* geht in der Rattenlaus, *Haematopinus spinulosus*. (Burm.), vor sich, die in Fig. 13

Fig. 13. **Haematopinus spinulosus** (Burm.).
Der zweite Wirt von *Trypanosoma lewisi*.
a Weibchen, *b* Männchen. Nach Tribocchi.

abgebildet ist. Die Laus findet sich im Frühjahr und Sommer meist recht zahlreich auf den Wanderratten, im Winter spärlich (15—20 Stück). Um Läuse zu infizieren, setzt man eine Anzahl solcher von vorher untersuchten, nicht infizierten, grauen Ratten an infizierte Ratten und untersucht sie zu verschiedenen Zeiten. Die Verdauung einer Blutmahlzeit dauert bei 25° C etwa 16 Stunden. Die Untersuchung der platten und durchsichtigen Läuse auf Trypanosomen kann entweder direkt geschehen oder man präpariert mit zwei spitzen Nadeln den Darmtraktus, zerzupft ihn in einem kleinen Tröpfchen Kochsalzlösung und fertigt davon Präparate.

Im Magen der Laus findet auf den mittleren Stadien der Verdauung die Reduktion der zur Befruchtung schreitenden Flagellaten statt. Dabei teilt sich der Kern, sowie der Blepharoplast je zweimal, wodurch je zwei Reduktionskerne gebildet werden und die Zahl der Chromosome von 8 auf 4 reduziert wird (Fig. 14). Da diese Stadien nur äußerst selten

Fig. 14.

Fig. 15.

Fig. 14. **Trypanosoma lewisi** (Kent).

Reduktion der Geschlechtsformen im Magen der Rattenlaus. *a* erste Reduktionsteilung des Blepharoplasten bei gleichzeitiger zweiter Reduktionsteilung des Hauptkernes. *b* zweite Reduktionsteilung des Blepharoplasten bei gleichzeitiger erster Reduktionsteilung des Hauptkernes. Vergr. ca. 2250:1. Nach v. Prowazek.

Fig. 15. **Trypanosoma lewisi** (Kent).

Reifung des Mikrogameten im Magen der Rattenlaus. *c* reifer Mikrogamet. Vergr. ca. 2250:1. Nach v. Prowazek.

zu beobachten sind, so begnügen wir uns mit dieser kurzen Darstellung. Später tritt ein deutlicher Unterschied zwischen Männchen und Weibchen zutage, indem die ersteren zusehends schmaler werden und ihr Kern ein lang gestrecktes, gewundenes Kernband bildet (Fig. 15). Je ein reifer Microgamet legt sich hierauf an einen reifen Macrogameten; es verschmelzen zunächst die Blepharoplasten, dann die Zellleiber mit den Hauptkernen (Fig. 16*a* und *b*). Durch Verlust der Geißeln und Einwandern des Blepharoplasten in den Hauptkern wird die Copula zu dem sog. Ookinet, einem gregarinenartigen Stadium mit einem einzigen Kern, der 8 periphere Chromosome und ein zentrales Caryosom besitzt (Fig. 16*c*).

Der Ookinet streckt sich weiterhin in die Länge, der Kern teilt sich heteropol, wobei der größte Teil des Caryosoms als Blepharoplast abgetrennt wird. Von diesem spaltet sich ein kleines Körnchen ab, das

durch abermalige Teilung direkt zum Randfaden der undulierenden Membran wird (Fig. 16 *d* und *e*). Durch weitere Abspaltung von Körnchen von dem Blepharoplasten und Längsstreckung dieser entstehen die Centralfasern.

Fig. 16. **Trypanosoma lewisi** (Kent).

Befruchtung (*a* und *b*) Oökinet (*c*) und Anbildung der Trypanosomenformen aus dem Oökineten (*d* und *e*). Vergr. ca. 2250:1. Nach v. Prowazek.

Alle die bisher geschilderten Entwicklungsstadien in der Laus sind nur äußerst selten zu beobachten; dagegen findet später im Körper der Laus eine reichliche Vermehrung der Trypanosomen durch Längsteilung statt und die daraus hervorgehenden Flagellatenformen bekommt man häufig zu Gesicht. Sie unterscheiden sich von denen im Rattenblut in der Regel durch die schlankere Gestalt und die Lage des Blepharoplasten, der häufig vor dem Hauptkern liegt (Fig. 17). Ähnliche Formen nehmen die Trypanosomen auch in den künstlichen Kulturen an.

Im Körper der Laus wechseln die Flagellatenstadien mit Ruheformen ab. Bei letzteren

kontrahiert sich das Plasma stark und färbt sich ganz dunkelblau. Der

Blepharoplast rückt ins Innere der Zelle und der Geißelapparat wird bis auf einen kleinen Fortsatz rückgebildet, mit

dem sich diese Formen zwischen die Epithelzellen einbohren. Auch kann die Geißel gänzlich verloren gehen (Fig. 18 *a—c*). Auf die räumlichen Verhältnisse des *Trypanosoma lewisi* im Körper der Laus, sowie auf den Weg, den der Parasit daselbst nimmt, wollen wir nicht näher eingehen, zumal letzterer noch nicht völlig aufgeklärt ist.

Fig. 18. **Trypanosoma lewisi** (Kent). Ruhestadien aus dem Darmkanal von *Haematopinus*. *b* mit rückgebildetem Geißelapparat; *a* und *c* mit gänzlicher Rückbildung des Geißelapparat. Vergr. ca. 2250:1. Nach v. Prowazek.

Fig. 17. **Trypanosoma lewisi** (Kent). Aus dem Darmkanal von *Haematopinus*. Vergr. ca. 2250:1. Nach v. Prowazek.

Trypanosoma brucei (Plimm. u. Bradf.).

Um zu zeigen, auf welche morphologischen Verhältnisse es bei der manchmal recht schwierigen Unterscheidung der einzelnen Trypanosomenarten ankommt (neben dem spezifischen Vorkommen und der Nichtüberimpfbarkeit auf manche Tierarten) sei hier noch ganz kurz das *Trypanosoma brucei* besprochen, der Erreger der Tsetsekrankheit in Afrika, der sich bei fast allen größeren Säugetieren daselbst findet und auf eine große Anzahl weiterer Tiere künstlich übertragbar ist.

Fig. 19. **Trypanosoma brucei** (Plimm. u. Bradf.).
b Beginn, *c* Ende der Längsteilung.
 Vergr. ca. 2250:1. Nach v. Prowazek.

Morphologisch unterscheidet sich diese Form von *Trypanosoma lewisi* einmal durch das mehr abgerundete Hinterende, ferner ist der Randfaden der undulierenden Membran viel länger und demgemäß letztere stärker gewunden (Fig. 19*a*). Die Bewegung besteht hauptsächlich in heftigen Schlängelungen ohne ausgiebige Ortsveränderung. Der Hauptkern liegt stets ungefähr in der Mitte des Körpers, der Blepharoplast ist kleiner als bei *Trypanosoma lewisi* und rund (Fig. 19). Die Vermehrung ist stets eine einfache Längsteilung, wobei der Blepharoplast am Hinterende liegen bleibt.

Haemoproteus noctuae (Celli u. Sanfelice).

Im Blute fast jedes Steinkauzes findet sich ein teilweise intracellulärer Parasit, der für die Auffassung der Blutparasiten von grundlegender Bedeutung ist. Ehe wir uns den Formen und der Entwicklung der Parasiten im Vogelblute zuwenden, wollen wir des besseren Verständnisses wegen zunächst die Entwicklung der Flagellatenstadien aus den befruchteten Ookineten beschreiben. Diese Vorgänge vollziehen sich unter normalen Umständen nur im Darm von *Culex pipiens*, des zweiten Wirtes. Die Infektionsversuche mit Stechmücken erfordern allerdings in der Regel sehr viel Zeit und Geduld, so daß sie sich für einen kurzen Kurs nicht eignen und wir uns daher mit der bloßen Beschreibung begnügen.

Die Entwicklung der Ookineten im Körper der Mücke.

Schon unter den Ookineten lassen sich an den Plasma- und Kernverhältnissen drei Formen unterscheiden, die sich bei der weiteren Entwicklung sehr verschieden verhalten, nämlich indifferente, männliche und weibliche. Allen dreien gemeinsam ist der gleiche Bau des Kernes. In diesem befinden sich acht Chromosomen an der Peripherie, sowie ein großes Caryosom in der Mitte, bei dem man (an Macerationsexemplaren) gleichfalls acht Chromosome unterscheiden kann, die in eine Plastinkugel eingelagert sind. Im Centrum des Caryosoms liegt ein Centralkorn (Fig. 20 a). Bei allen Ookineten wird im weiteren Verlauf am hinteren Ende ein Teil des Plasmas mit dem Pigment und den Reduktionskernen

Fig. 20. **Haemoproteus noctuae** (Celli u. Sanfelice).
Entwicklung der indifferenten Trypanosomenformen im Mitteldarm
von *Culex*. Nach Schaudinn.

(näheres darüber später) abgeschnürt. In Bau und Größe des Plasmaleibes (Verhältnis zum Kern), sowie im Verlauf des weiteren Schicksales treten nun die Unterschiede zutage.

a) Indifferente Formen. Die indifferenten Ookineten besitzen mittlere Größe. Zunächst verschmelzen die acht Chromosome des Caryosoms mit Hilfe der Plastinsubstanz mit den acht peripheren Chromosomen des Kernes, so daß nur das Centralkorn in einem hellen Hofe übrig bleibt (Fig. 20 b). Dann teilt sich der Kern durch eine heteropole Mitose, wobei das Centralkorn als eine Centralspindel mit Centriolen fungiert. Die acht Chromosome teilen sich und rücken an die gegenüberliegenden Pole. Die eine Spindelhälfte ist kleiner und enthält mehr Plastinsubstanz (Fig. 20 c). Das Produkt der Teilung ist ein großer Kern, der Hauptkern, und ein dichter kleinerer Kern, der Blepharoplast oder lokomotorische Kern, der mehr Plastin enthält, was bei der Giemsa-Färbung durch den violetten Ton zutage tritt. Beide Kerne sind durch die Centralspindel dauernd verbunden. Der Blepharoplast teilt sich nun wiederum durch eine weniger ausgeprägte heteropole Mitose, wobei der kleinere Kern an die Peripherie des Zelleibes zu liegen kommt (Fig. 20 c).

Wie der Hauptkern mit dem Blepharoplast, so steht der kleinere Kern mit diesem durch eine Centralspindel dauernd in Verbindung. Der dritte, kleinste Kern teilt sich nun wiederum heteropol, aber nun in der Längsachse des Tieres (Fig. 20 f). Diese dritte Spindelfigur wird direkt zum lokomotorischen Apparat der Zelle, indem die Centralspindel an den Rand rückt, sich lang auszieht und dadurch zum Randfaden der undulierenden Membran wird, während die den acht Chromosomen entsprechenden Mantelfasern sich auf beide Seiten des abgeplatteten Tieres verteilen, wo sie an der Oberfläche die Periplastfasern darstellen, die wir schon von *Trypanosoma lewisi* her kennen, die hier aber viel deutlicher ausgebildet sind. Nach vorn setzen sich auch die Periplastfasern in die abgeplattete freie Geißel weiter, die also aus einem excentrischen Randfaden und acht Mantelfasern besteht, die durch eine feine Protoplasmaschicht verbunden sind (Fig. 20 h).

Die Vermehrung der indifferenten Flagellaten erfolgt wie bei anderen Trypanosomen stets durch Längsteilung. Auch bei *Haemoproteus* wechseln in der Stechmücke Bewegungs- mit Ruhestadien ab. Während der letzteren bohrt sich der Parasit mit seiner Geißel, die oft bis auf einen kurzen stabförmigen Fortsatz rückgebildet wird, in eine Darmepithelzelle ein. Auch die Ruheformen können sich durch Längsteilung vermehren.

Auf die interessanten Beziehungen zwischen der Biologie der Parasiten und der Biologie der Mücke, sowie auf den komplizierten Weg, den der Parasit

Fig. 21. **Haemoproteus noctuae** (Celli u. Sanfelice).
Entwicklung der weiblichen Trypanosomenformen im Mitteldarm von *Culex*. Nach Schaudinn.

im Körper der Mücke einschlägt, wollen wir hier nicht näher eingehen.

b) Weibliche Formen. Die Ookineten weiblichen Charakters unterscheiden sich von den indifferenten durch das verschiedene Aussehen des Protoplasmas, das hier mit dunkelfärbaren Körnern (Reservestoff) dicht erfüllt ist. Ferner ist der Kern im Verhältnis zum Zellvolumen kleiner als bei den indifferenten. Zunächst wird auch hier durch eine heteropole Mitose ein zweiter kleiner plastinhaltiger Kern gebildet (Fig. 21 a). Derselbe trennt sich jedoch vom Hauptkern und vermehrt sich sofort durch drei rasch aufeinanderfolgende Zweiteilungen (Fig. 21 b) zu acht kleinen kompakten Kernen, die in den hinteren Abschnitt der Zelle rücken. Jeder der acht Kerne bildet nun durch heteropole Mitose je einen kleinen zweiten Kern, der mit ihm in Verbindung bleibt (Fig. 21 c). Im weiteren Verlauf gehen die acht Doppelkerne (männliche Kerne, wie wir bald sehen werden) zugrunde, indem sie allmählich aufgelöst werden, während der Hauptkern nochmals einen kleinen Kern bildet, der zum Blepharoplasten wird und von dem aus in derselben Weise wie bei der indifferenten Form der lokomotorische Apparat gebildet wird (Fig. 21 c, d). Die ausgebildeten weiblichen Flagel-

laten unterscheiden sich von den indifferenten neben der schon erwähnten stärkeren Färbbarkeit durch plumpere Gestalt und schwächer entwickelten Geißelapparat; der Blepharoplast ist kleiner, die Geißel kürzer. Die weibliche Form kann im weiteren Wachstum die dreifache Größe der indifferenten erreichen, ist aber nicht mehr teilungsfähig. Auch sie kann in einen gregarinenartigen Ruhezustand übergehen unter vollständigem Verlust der Geißel.

Vermöge des reichen Gehaltes an Reservestoffen sind die gregarinenähnlichen Ruhestadien der weiblichen Form äußerst widerstandsfähig und bleiben bei ungünstigen Lebensbedingungen am längsten erhalten, während die indifferenten und männlichen Formen bald absterben. Ohne hier auf die genaueren biologischen Verhältnisse im Mückenkörper einzugehen, sei nur erwähnt, daß sie dadurch berufen sind, die Art zu erhalten, indem sie bei Eintritt günstigerer Bedingungen sämtliche Formen durch Parthenogenese wieder aus sich hervorgehen lassen und so die Recidive verursachen. Da dieser Vorgang auch im Blut eine große Rolle spielt, so seien hier die wichtigen und interessanten Prozesse, die sich am Kern abspielen und die eine Art Autogamie des Blepharoplasten darstellen, kurz geschildert. Die ruhenden Weibchen haben ganz das Aussehen eines Ookineten, nur fehlt das Pigment und es findet sich bereits der Blepharoplast neben dem Kern, der wieder ein kleines Caryosom aufweist (Fig. 22a).

Durch heteropole

Mitose entsteht

nun ein zweiter

kleiner Kern, so

daß nun zwei

kleine Kerne, der

alte Blepharoplast

und der neuent-

standene neben

dem Hauptkerne

liegen. Durch je

zwei Teilungen

stoßen nun die

beiden kleinen

Kerne je zwei dem

Untergang geweihte Reduktionskerne ab (Fig. 22c), rücken von entgegengesetzten Seiten in den Hauptkern hinein (Fig. 22d) und verschmelzen zu einem neuen Caryosom (Fig. 22e und f). Durch diese Art Selbstbefruchtung ist das Weibchen gewissermaßen zu einem indifferenten Ookineten geworden und kann nun in derselben Weise wie diese die drei Flagellatenformen aus sich hervorgehen lassen.

c) Männliche Formen. Die Ookineten, die zu männlichen Formen werden, unterscheiden sich von den weiblichen und indifferenten durch das helle Protoplasma. Die Zellgröße ist durchschnittlich kleiner als bei den andern Arten, der Kern im Verhältnis zum Plasma dagegen auffallend groß und sehr chromatinreich (Fig. 23a). Die Kernveränderungen gleichen zunächst ganz denen der weiblichen Formen, d. h. der durch heteropole Mitose entstandene kleine Kern vermehrt sich auf 8. Nun geht aber hier im Gegensatz zur weiblichen Form der große Kern zugrunde und die kleinen Kerne entwickeln sich weiter. Diese bilden nun je einen ziemlich großen Blepharoplasten (Fig. 23d): der männliche

Fig. 22. **Haemoproetus noctuae** (Celli u. Sanfelice).
Parthenogenese einer weiblichen Form im Gregarinenzustand.
Nach Schaudinn.

Ookinet, oder Microgametocyt, rundet sich ab und die 8 Doppelkerne rücken an die Peripherie, wobei der Blepharoplast der Oberfläche zugekehrt ist. (Fig. 23 *c*.) Um jede Kerngruppe verdichtet sich das Plasma etwas, der Blepharoplast einer jeden bildet in derselben Weise wie die indifferenten Formen einen Geißelapparat und es lösen sich dann 8 kleine Trypanosomen von dem großen, den ursprünglichen Hauptkern (vegetativen weiblichen Kern) enthaltenden Restkörper ab. Der Geißelapparat ist bei den kleinen männlichen Trypanosomenformen,

Fig. 23. **Haemoproteus noctuae** (Celli u. Sanfelice).
Entwicklung der männlichen Trypanosomenformen (Microgameten) im Mitteldarm
von *Culex*. Nach Schaudinn.

oder Microgameten, gegenüber den übrigen ungemein stark ausgebildet, daher ihre außerordentliche Beweglichkeit. Sie sind nicht vermehrungs und entwicklungsfähig, sie gehen stets zugrunde.

Die indifferenten Formen im Vogelblut.

Die Infektion des Steinkauzes geschieht durch indifferente Trypanosomenformen, die durch den Stich einer infizierten Mücke eingeführt werden. Die jungen Trypanosomen heften sich an einen Erythrocyten, bilden die Geißel zurück (Fig. 24 *b*) und haben nun gregarinenartiges Aussehen. Der lokomotorische Kern rückt dicht an den Hauptkern heran, ist aber als solcher deutlich zu erkennen. (Fig. 24 *c*.) Sie rücken allmählich in das Blutkörperchen von außen etwas ein und wachsen auf Kosten desselben heran. Das unverdauliche Hämoglobin wird im Körper des Parasiten in Form von bräunlichem Pigment abgelagert. In der Nacht wandelt sich dieses bohnenförmige, intrazelluläre Stadium (die sog. Halteridiniumform), in den innern Organen wieder in die Trypanosomenform um, indem sie in der oben beschriebenen Weise einen neuen Geißelapparat bildet. Nach kurzem Umherschwärmen setzt sich der Parasit wieder an einem Blutkörperchen fest, bildet die Geißel zurück und wächst in der schon beschriebenen Weise weiter. Des Nachts nimmt der Parasit stets wieder Trypanosomenform an. Erst nach 6 Tagen hat er seine definitive Größe erreicht, bildet wieder einen Geißelapparat und vermehrt sich in diesem Zustande durch rasch auf einander folgende Längsteilungen, wobei die Teilprodukte immer kleiner werden. Die dadurch entstandenen kleinen Trypanosomenformen durchlaufen nun wieder denselben sechsstägigen Entwicklungsgang.

Von der eben geschilderten Entwicklung der indifferenten Formen im Vogelblut wird man in der Regel nur die verschiedenen Wachstumsstadien in resp. auf den Erythrocyten zu Gesicht bekommen. Sie sind leicht an der hantelähnlichen Gestalt zu erkennen, der Kern des befallenen Blutkörperchens bleibt dabei in seiner Lage ungestört. Diese beiden Eigentümlichkeiten unterscheiden unsern Parasiten von dem gleichfalls im Vogelblut vorkommenden mehr kugeligen und den Kern des Blutkörperchens auf die Seite drängenden *Proteosoma*. Die Trypanosomenformen sind sehr schwer zu sehen und es scheint, daß es auch Arten von *Haemoproteus* gibt, bei denen überhaupt keine Trypanosomenformen mehr vorkommen, die also die Fähigkeit, aus dem Ruhe- in den Bewegungszustand überzugehen, verloren haben. Aber selbst wenn keine Flagellatenformen vorhanden sind, so können wir uns von der Trypanosomenatur des *Haemoproteus* schon dadurch überzeugen, daß neben

Fig. 24. **Haemoproteus noctuae** (Celli u. Sanfelice).

Verhalten und Entwicklung der indifferenten Trypanosomen im Blut der Eule. *a* Anheftung des jüngsten Stadiums an den Erythrocyten mit dem Vorderende; *b* Ruhestadium desselben; *c* Ruhestadium nach ca. 48 Stunden; *d* Auswanderung im gregarinenartigen Zustand, Beginn der Ausbildung des Geißelapparates; *e* das aus *d* entstandene freibewegliche Trypanosoma, welches wieder an einen Erythrocyten anhaftet; *f* Ruhezustand nach 5 Tagen; *g* ausgewachsenes Trypanosoma. Nach Schaudinn.

dem Kern der lokomotorische Kern oder Blepharoplast als charakteristisches Zeichen eines doppelkernigen Flagellaten stets zu beobachten ist.

Die Geschlechtsgenerationen im Blut.

Aus den jungen Trypanosomenformen entwickeln sich nicht nur die schon besprochenen indifferenten Individuen, sondern ein Teil wird zu Geschlechtsformen, den weiblichen Macrogametocyten und den männlichen Microgametocyten. Die Macrogametocyten sind ausgezeichnet durch ein dunkles reservestoffreiches Protoplasma und kleinen Kern und Blepharoplast. Am sichersten kann man sich davon bei schon größeren Individuen überzeugen. Die Entwicklung geht langsamer vor sich als bei den indifferenten Formen. Auch hier wechseln Ruhezustände mit Bewegungszuständen ab, jedoch viel weniger häufig und in der Regel hat die weibliche Form nicht mehr die Fähigkeit, einen Geißelapparat zu bilden.

sondern bewegt sich gregarinenartig. Außerdem scheint die weibliche Form in den Erythrocyten zu liegen und bewirkt dadurch, sowie durch das längere Verbleiben in dem Blutkörperchen eine größere Zerstörung desselben, so daß der Kern oft ganz an den Rand gedrückt wird.

Nach einiger Zeit hört die Bildung von indifferenten Individuen völlig auf und es bleiben nur noch Geschlechtsformen im Vogelblut zurück. Die männlichen Formen sind wenig beständig und gehen rasch zugrunde. Der Vogel beherbergt dann nur noch erwachsene weibliche Formen. Nach längerer oder kürzerer Pause sind diese Macrogametocyten instande, sich durch Parthenogenese fortzupflanzen: dadurch entstehen die Recidive beim Vogel. Die sich hier abspielenden Kernvorgänge sind die gleichen wie sie oben von den weiblichen Formen in der Stechmücke beschrieben wurden.

Die Microgametocyten weisen im Gegensatz zu den weiblichen und indifferenten Formen ein sehr helles und hinfälliges Protoplasma und einen großen Kern auf, auch hier bei erwachsenen Formen am besten erkenntlich. Wie bei der männlichen Form in der Mücke werden auch hier acht Doppelkerne (aus je einem Hauptkern und Blepharoplast bestehend) gebildet, die aber innerhalb der ursprünglichen Kernmembran vereinigt bleiben, sodaß ein ungemein großer, scheinbar einheitlicher Kern vorgetäuscht wird. Die Microgametocyten gehen im Blute schon als solche zugrunde, ohne zur Ausbildung der Microgameten zu gelangen.

Reifung und Befruchtung.

Die Reifung und Befruchtung von *Haemoproteus* geht normalerweise im Magen einer Stechmücke vor sich, die Vogelblut mit erwachsenen Geschlechtsformen in sich aufgenommen hat. Nur infolge der unwäzenden Veränderung in den äußeren Lebensbedingungen vollzieht sich

Fig. 25. *Haemoproteus noctuae*.

a Macrogamet nach Beendigung der Reifung, rechts Rest des Erythrocyten, links reife Microgameten; *b* Bildung des Ookineten, Kern im Stadium der Befruchtungsspindel, darunter zugrunde gehende Reduktionskerne. Nach Schaudinn.

die Reifung der Macrogametocyten, der Zerfall der Microgametocyten in die Microgameten und die Befruchtung der reifen Macrogameten durch je einen Microgameten. Bei *Haemoproteus*-Arten gelingt es aber auch, diese Vorgänge im hängenden

Tropfen zu beobachten, wenn man ein kleines Tröpfchen starkin-

fizierten Blutes mit einem Tropfen Serum + 0,6% Kochsalzlösung (1 Teil Serum auf 9 Teile Kochsalzlösung) mischt. Gleichzeitig bringt man eine Anzahl derartig beschickter Deckgläser in eine fenestrierte Kammer und fixiert in entsprechenden Zeitintervallen.

Zunächst runden sich Macro- wie Microgametocyten kugelig ab und sprengen dabei den als dünne Hülle sie umgebenden Erythrocyten, dessen Reste mit Kern dann daneben liegen (Fig. 25a). Die acht Doppelkerne des Microgametocyten rücken an die Oberfläche, jeder der acht Blepharoplasten bildet einen Geißelapparat resp. Randsaum einer undulierenden Membran unter gleichzeitiger Vorwölbung von acht Protoplasmakugeln und es entstehen so an der Oberfläche aus 4 bis 8 (nicht alle gelangen zur Entwicklung) Microgameten, die ganz den Bau eines *Trypanosoma* besitzen. (Vgl. hierzu Fig. 23b.) Es sind schmale, langgestreckte, spermatozoenartige Zellen mit undulierender Membran, einem den ganzen Körper durchziehenden aus vier Chromosomen bestehenden Kernstab und einem gleichfalls langgestreckten Blepharoplasten (Fig. 25a links). Gleichzeitig vollziehen sich am Macrogametocyten komplizierte Reduktionsteilungen, die im Prinzip vollkommen mit den sog. Reifeteilungen der tierischen Eier übereinstimmen, indem die Zahl der Chromosomen auf die Hälfte reduziert wird, in unserem Falle von 8 auf 4. Ein Unterschied gegenüber der Eireife der Metazoen besteht nur darin, daß hier zwei Kerne, der Haupt- oder vegetative Kern und der Blepharoplast oder lokomotorische Kern, die Reduktion erfahren. Das Endresultat sehen wir in Fig. 25a, links der reduzierte Hauptkern und Blepharoplast mit je vier Chromosomen, rechts zwei doppelte Reduktionskerne aus vegetativem und lokomotorischem Teil bestehend, die allmählich resorbiert werden. Die ausgebildeten Microgameten umschwärmen nun die reifen Macrogameten und es dringt je ein Microgamet in einen Macrogameten ein, wobei der Randfaden der undulierenden Membran körnig zerfällt. Die Vorgänge der Reifung und Befruchtung vollziehen sich im hängenden Tropfen in etwa 20 Min. In weiteren 10 bis 20 Min. geht der kugelige befruchtete Macrogamet durch Hervorwölben eines spitzen Fortsatzes in eine gregarinenartige Gestalt über, die leicht gekrümmt ist, den Ookineten. Mit den äußerlichen Veränderungen geht Hand in Hand im Innern der Zelle die eigentliche Caryogamie, indem zunächst die beiden vegetativen Kerne miteinander verschmelzen und eine langgestreckte spindelartige Gestalt annehmen, die sog. Befruchtungsspindel, die mit einer Teilungsspindel jedoch nichts zu tun hat (Fig. 25b). An die Pole der Spindel rücken hierauf die beiden Blepharoplaste; unter allmählicher Abrundung des Kernes wandern sie in denselben hinein, um hier miteinander zu verschmelzen. Hieraus resultiert der fertige Ookinet, mit dem wir die Schilderung begonnen haben.

Der Ookinet bewegt sich, wie die schon erwähnten geißellosen weiblichen Formen im Blut der Eule gregarinenartig, d. h. er vollführt Kontraktions- und seitliche Knickbewegungen des Körpers, während die eigentliche Ortsveränderung in einem Gleiten ohne Körperbewegung besteht und wohl wie bei den Gregarinen auf das Ausscheiden eines erstarrenden Gallertfadens zurückzuführen ist.

Auch in künstlichen Kulturen findet man in den ersten 24 Stunden vereinzelte Ookineten. In den nächsten Tagen treten darin wie im Darm von *Culex* Flagellatenformen auf.

Anhang: *Culex* und *Anopheles*.

Obwohl in diesem Kurs wegen der Kürze der Zeit die Infektionsversuche mit Stechmücken (*Culex pipiens*) und das praktische Studium

der in denselben ablaufenden Entwicklung von *Haemoproteus* keine Berücksichtigung erfahren haben, wollen wir uns doch wenigstens in der Präparation derselben üben und uns mit den wichtigsten Bauverhältnissen bekannt machen, zumal der anatomisch ähnlichen Gattung *Anopheles*, die ebenfalls mit in unsere Betrachtung gezogen wird, eine große Bedeutung für die menschliche Malaria zukommt.

Culex pipiens gehört in die Klasse der Dipteren oder Zweiflügler und zwar zur Familie der Culiciden oder Stechmücken. Das vollentwickelte Insekt (Imago) von *Culex* hat einen kleinen Kopf mit zwei großen Netzaugen; vorn sitzt der lange Stechrüssel, ein aus sechs Teilen bestehender Apparat, der in einer Scheide, der Unterlippe (Labium) steckt, die beim Stechen nicht in die Haut eindringt, sondern dabei spitzwinklig einknickt (Fig. 28). Zu beiden Seiten des Rüssels stehen die beiden Taster oder Palpen, die beim Weibchen sehr kurz, beim Männchen dagegen lang (länger als die Fühler), nach oben aufgebogen und mit langen Borsten besetzt sind. Rechts und links stehen die gegliederten Fühler oder Antennen, beim Männchen stark gefiedert, beim Weibchen dagegen nur an jedem Gliedansatz einen Kranz kurzer Borsten aufweisend (Fig. 26 links).

Fig. 26.

Culex.

Kopftheile vom Weibchen (oben) und Männchen (unten) des *Culex pipiens*.

F Linker Fühler (Antenne). T Linker Taster (Palpe). R Rüssel. Th Thorax.

Nach Eysell.

Anopheles.

Kopftheile vom Weibchen (oben) und Männchen (unten) des *Anopheles*.

Durch einen dünnen Halsteil ist der Kopf mit dem stark ausgebildeten Thorax verbunden, an dem die drei Paar Beine und die beiden Flügel (nebst den rudimentären Schwingen) sitzen. Das Abdomen besteht aus acht Ringen. Die durch die gefiederten Fühler ausgezeichneten Männchen sind kleiner als die Weibchen. Nur die letzteren saugen Blut.

Hier seien gleich die unterscheidenden Merkmale der gleichfalls zu den Culiciden gehörigen Gattung *Anopheles* angefügt, deren verschiedene

Arten als die einzigen Überträger der menschlichen Malaria in Betracht kommen.

Das wichtigste Merkmal besteht in der Verschiedenheit der Taster. Diese sind beim *Anopheles* weibchen länger (Fig. 26 rechts ♀), nämlich genau wie beim Männchen ebenso lang wie der Stechrüssel, während das *Culex* weibchen, wie schon erwähnt, nur ganz kurze Taster besitzt. Ferner sind die Taster des *Anopheles* männchen an den Enden kolbig verdickt (und nicht länger als die Fühler), die des *Culex* männchen dagegen gleichmäßig dick, aufgebogen und mit Borsten besetzt (und länger als die Fühler). Vergl. Fig. 26.

Auch infolge einer biologischen Eigentümlichkeit lassen sich beide Gattungen im Leben leicht auseinander halten. Der *Culex* hält nämlich beim Sitzen an einer Wand sein Abdomen parallel zu derselben, oder gegen sie geneigt, der Leib des *Anopheles* steht dagegen unter einem Winkel von 45° — 80° von der Wand ab. Außerdem bildet bei *Culex* Leib und Brust einen stumpfen Winkel, bei *Anopheles* aber eine gerade Linie, in deren Verlauf auch Kopf und Stechrüssel stehen (Fig. 27).

Der Bau der inneren Organe ist bei beiden Gattungen ziemlich gleich, so daß die Beschreibung der Anatomie von *Culex* zugleich auch für die medizinisch wichtigere Gattung *Anopheles* gelten kann. (Hierzu Fig. 28.)

Unter den inneren Organen interessieren uns vor allem der Darmtraktus und die Speicheldrüsen. Letztere sind paarige Organe und liegen im Prothorax. Jede besteht aus drei Lappen, einem kleineren mittleren und zwei größeren seitlichen. Sie münden in einen gemeinsamen Ausführungsgang im Hypopharynx (Fig. 28 *gl. sal.*).

An dem Darmtraktus unterscheidet man Vorder-, Mittel- und Hinterdarm. Der ectodermale (mit Chitin ausgekleidete) Vorderdarm beginnt mit der mit Sinnesorganen ausgestatteten Mundhöhle und setzt sich in den als Pmporgan dienenden Pharynx (*ph.*) weiter. Die Grenze gegen den folgenden Teil des Vorderdarmes, den Ösophagus (*oes.*), wird durch die Pharynxklappe, eine ringförmige, mit starker Ringmuskulatur ausgestattete Einschnürung, gekennzeichnet. In den im hinteren Teile stark erweiterten Ösophagus münden drei große Aussackungen (Reservoirs), zwei paarige, seitlich dorsal gelegene (*s. acc.*) und eine längere unpaare ventral (*s. princ.*). Sie dienen zur ersten Aufnahme des Blutes und beherbergen in der Regel eine Anzahl Sproßpilze, die beim Stich mit in die Haut des Menschen entleert werden und deren Enzyme die Quaddelbildung erzeugen. Der letzte Abschnitt des Vorderdarmes, der Vormagen oder Proventriculus (*prov.*) ist bei der nüchternen Mücke in den Vorderteil des Mitteldarmes eingestülpt und dann vielfach gefaltet.

Fig. 27.

Culex.

Anopheles.

Schematische Umrisse, um die charakteristische Stellung der beiden Gattungen an der senkrechten Wand zu zeigen. Nach Eysell.

Der Mitteldarm (*st.*) ist der entodermale Teil des Darmkanales und dient der Verdauung. Seine Wandungen besitzen ein einschichtiges Epithel ohne Cuticula (wie Vorder- und Enddarm), der hintere Teil ist erweitert und wird vielfach als Magen bezeichnet.

Der gleich dem Vorderdarm aus Ectoderm hervorgegangene und daher mit Chitin bekleidete Enddarm besteht aus Ileum (*il.*), Colon und Rectum. An ersterem münden gleich zu Beginn die fünf malpighischen Gefäße (*t. m.*), Exkretionsorgane. Das Colon (*col.*) ist lang und dünn.

Fig. 28. *Culex pipiens* (Weibchen).

Sagittalschnitt schematisch nach Schaudinn.

a. Antenne. *aort.* Aorta. *c.* Herz. *col.* Colon. *gl. sal.* Linke Speicheldrüse. *hyp.* Hypopharynx. *il.* Ileum. *l. inf.* Unterlippe. *l. sup.* Oberlippe. *oes.* Ösophagus. *ol.* Olive. *p.* Palpe. *ph.* Pharynx. *prov.* Vormagen. *rect.* Rectum. *s. acc.* Nebenreservoir (Saugmagen). *s. princ.* Hauptreservoir (Saugmagen). *st.* Mitteldarm. *t. m.* Malpighische Schläuche.

steigt erst dorsal auf und dann wieder ventral abwärts, ein gleichschenkeliges Dreieck bildend. Die Spitze des Winkels (Umbiegungsstelle) wird Basilische Kurvatur genannt. Das erweiterte Rectum (*rect.*) mündet nach außen.

Das Herz (*c.*) bildet einen dorsal vom Darm gelegenen Schlauch, der an der Basilischen Kurvatur beginnend, durch das Abdomen sich erstreckt und im Thorax in die dünnere Aorta (*aort.*) ausläuft, die bis in den Halsteil sich verfolgen läßt.

Die Geschlechtsorgane liegen dorsal von dem Enddarm und können sich bei starker Ausbildung weit nach vorn ausdehnen. Auf unserer Abbildung sind sie der Klarheit wegen fortgelassen.

Um die Eingeweide zu präparieren, tötet man die Mücke mit einem Tropfen Äther. Hierauf bringt man sie in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf einen Objektträger und entfernt Flügel und Beine.

Mit scharfem Messerchen schneidet man das Abdomen im ersten Abdominalring durch (Pfeil *A* in Fig. 29), trennt

Fig. 29. Schema eines *Culex* zur Erläuterung der Präparation. Nach Eysell.

den siebenten Leibesring vom sechsten ab, indem man sie mit zwei Nadeln bei *a b* und *c d* vorsichtig voneinander löst und zieht dann die Eingeweide mit dem siebenten Leibesringe heraus, dabei den ersten Leibesring mit einer Nadel festhaltend. Die Speicheldrüse, die für uns von besonderer Wichtigkeit ist, da sie bei der verwandten *Anopheles* die Malariaparasiten beherbergt, präparieren wir auf folgende Weise. Man preßt durch Zusammendrücken des Thorax mit einer Nadel den Hals hervor (Fig. 29) und schneidet dem Pfeil *B* entlang den vorderen Teil des Thorax ab. „Jetzt zieht man von dem Punkte *g* und *f* aus das Bruststück bis zu seinem Ansatz am Kopfe auseinander, fixiert diesen durch eine im Punkte *h* eingestochene Nadel und streicht mit der Nadel die am Boden der Mundhöhle hängenden Speicheldrüsen ab.“ Am besten führt man die Präparation der Mücken auf einem schwarzen Untergrunde, die der Speicheldrüse unterm Mikroskop oder besser Präpariermikroskop aus.

Plasmodium vivax (Grassi u. Fel.).

Frische menschliche Malaria wird man bei uns nur äußerst selten zu untersuchen die Gelegenheit haben. Man muß sich daher in der Regel mit der Demonstration fertiger Präparate begnügen. Wir bringen deshalb hier nur eine kurze Schilderung des Zengungskreises von *Plasmodium vivax*, des Tertianparasiten des Menschen und schließen daran die Unterschiede der beiden anderen menschlichen Formen an.

Die Plasmodien des Menschen sind von allen Blutparasiten diejenigen, die am engsten an die parasitische Lebensweise im Blute des Menschen einerseits und im Körper der Mücke (hier die Gattung *Anopheles*) andererseits angepaßt sind und infolge ihrer endoglobulären Lebensweise den Charakter der binucleaten Flagellaten am meisten eingebüßt haben. Nur in wenigen Stadien (Microgameten, ein Teil der Sporozoiten und Merozoiten) läßt sich die Geißel resp. undulierende Membran und die Doppelkernigkeit nachweisen (während letztere z. B. bei den sonst völlig übereinstimmenden *Proteosoma* stets zutage tritt).

Der ganze Entwicklungskreis läßt sich in drei Etappen einteilen: 1. die agametische Vermehrungsperiode im Blute des Menschen, die Schizogonie; 2. die Entstehung der Geschlechtsformen im Blute und die Reifung und Befruchtung derselben im Mückenmagen; 3. die Wachstumsperiode und agametische Vermehrung nach der Copulation in der Mücke, die Sporogonie.

1. Schizogonie. Die Infektion des Menschen geschieht durch den Stich einer infizierten Mücke, wodurch die Sporozoiten aus der Speicheldrüse in das Blut gelangen. Hier dringt ein Teil derselben aktiv in die Erythrocyten ein (Fig. 30, 2), andere heften sich auf der Oberfläche der Erythrocyten an und sinken allmählich ein. Der Sporozoit rundet sich ab und wächst auf Kosten des Blutkörpers heran, wobei sich anfangs eine große Nahrungsvacuole bildet (sog. Ringform, Fig. 30, 3). Im nach Giemsa blau gefärbten Plasma hebt sich das Caryosom des Kernes deutlich rot ab, während das Liningerüst nur als schmale helle Zone zu erkennen ist. Nach etwa sechs Stunden treten infolge der Verdauung die charakteristischen hellbräunlichen Pigmentkörnchen auf. Weiterhin wird der Parasit beim Wachstum sehr amöboid beweglich, wobei das stark vermehrte Pigment lebhaft mitbewegt wird. Im Plasma des befallenen Erythrocyten treten, sobald der Tertianparasit etwa ein Drittel desselben eingenommen hat, bei starker Giemsa färbung eine

Fig. 30. Zeugungskreis von **Plasmodium vivax**. Nach Grassi und Schaudinn aus Lühe, etwas verändert.

Oberhalb des Striches Stadien im Blut des Menschen, unterhalb des Striches Stadien im Körper der Mücke.
 1-7 Schizogonie, 1 Sporozoit, 2 Eindringen des Sporozoiten, 3 u. 4 Wachstum des Schizonten, 5 u. 6 Kernteilung des Schizonten, 7 Bildung der Merozoiten, 8 Merozoiten, 9a-12a Wachstum des Macrogametocyten, 9b-12b Wachstum des Microgametocyten, 13c-17c Parthenogenese des Macrogametocyten, 13a u. 14a Reifung des Macrogameten, 13b u. 14b Bildung der Microgameten, 15b Microgamet, 16 Befruchtung, 17 Ookiniet, 18-20 Einwandern des Ookineten in die Magenwand, 20-25 Sporogonie, 22 u. 23 Kernvermehrung im Sporonten, 24 u. 25 Bildung der Sporozoiten, 26 Überwandern der Sporozoiten zur Speicheldrüse, 27 Speicheldrüse der Mücke mit Sporozoiten. (Vergr. 1-17 c. 1200 : 1, 18-27 c. 600 : 1.)

Anzahl feiner rotgefärbter Tüpfelchen auf, was für den Tertianparasiten charakteristisch ist. Am Schlusse des Wachstums (nach ca. 36 Stunden) rundet sich der Parasit ab und die Beweglichkeit hört auf. Das Blutkörperchen ist dabei meist bis auf das doppelte vergrößert und abgebläht. Zu Beginn der multiplen Vermehrung, der Schizogonie, teilt sich der Kern und zwar zuerst durch eine einfache Mitose, später mehr unregelmäßig, amitotisch, in 10—20 Tochterkerne (in der Regel 16, Fig. 30, 5 und 6). Diese verteilen sich auf der Oberfläche, umgeben sich mit einer Schicht von Protoplasma und der Schizont zerfällt (48 Stunden nach dem Eindringen in den Erythrocyten) in so viel Teile als Kerne gebildet waren, während das Pigment mit einem kleinen Restkörper zurückbleibt (Fig. 30, 7). Die Produkte dieser Vermehrung werden Merozoiten genannt. Sie dringen in derselben Weise wie die Sporozoiten in die Blutkörperchen ein und der soeben geschilderte Wachstums- und Vermehrungsvorgang wiederholt sich mehrmals in der gleichen Weise innerhalb je 48 Stunden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 11 Tagen, wenn die Zahl der Parasiten eine gewisse Größe erreicht hat, fällt jedesmal mit dem Eindringen der Merozoiten ein Fieberanfall zusammen. Die Schizogonie von *Plasmodium* ist der fortgesetzten Längsteilung der indifferenten *Haemoproteus*-Formen im Blut der Eule nach der sechsstägigen Wachstumsperiode vergleichbar und offenbar die Folge des dauernden Verbleibens in der Wirtszelle.

2. Geschlechtsgeneration. Schon frühzeitig wachsen neben den indifferenten Individuen (Schizonten) einzelne Merozoiten zu Geschlechtsformen heran, den männlichen Microgametocyten und den weiblichen Macrogametocyten. Dieselben brauchen zu ihrem Wachstum länger als die Schizonten, nämlich 94 Stunden. Dem langsameren Wachstum ist es wohl zuzuschreiben, daß die Nahrungsvacuole (Ringform) in der Regel fehlt und daß mehr und größere Pigmentkörper gebildet werden. Die amöboide Beweglichkeit ist viel geringer als bei den Schizonten.

Der Macrogametocyt (Fig. 30, 9a—12a) ist ausgezeichnet durch ein intensiv färbbares stark mit Reservestoffen beladenes Protoplasma und verhältnismäßig kleinen Kern, der fast immer peripher liegt. Der Macrogametocyt erreicht meist die doppelte Größe wie der Schizont. Die Microgametocyten (Fig. 30, 9b—12b) haben ein sehr blasses und anscheinend sehr hinfalliges Protoplasma und verhältnismäßig großen Kern. Das Pigment ist beweglicher und noch reichlicher als beim Macrogametocyten und hat eine mehr grünliche Farbe. Die Größe ist bedeutend geringer als bei jenem und übertrifft selten die der Schizonten.

Wie bei *Haemoproteus* verschwinden die Schizonten (indifferenten Formen) und Microgametocyten stets nach einiger Zeit aus dem Blut und es bleiben nur die Macrogametocyten erhalten. Letztere sind auch die einzigen Formen, die dem Chinin widerstehen. Infolge des starken Reservestoffgehaltes und der Widerstandsfähigkeit können sie monate — ja jahrelang im Körper bleiben und wie bei *Haemoproteus* unter besonderen Umständen durch Parthenogenese sich wieder vermehren (Fig. 30, 12a—17c). Hierbei bildet der Kern zunächst einen großen Reduktionskern (die genaueren Kernvorgänge, die wohl ähnlich wie bei *Haemoproteus* sein dürften, sind hier noch nicht ermittelt), die Vermehrung geschieht hierauf wie bei den Schizonten, während der Reduktionskern in einem großen Restkörper zurückbleibt. Auf diese Weise kann der Körper wieder mit Parasiten überschwemmt werden und ein Malaria-recidiv ausbrechen.

Die Reifung der Gametocyten und die Befruchtung vollzieht sich normalerweise nur im Mitteldarm (Magen) eines *Anopheles*, der gametenhaltiges Blut gesogen hat. Die in dem scheinbar einheitlichen großen Kern des Gametocyten schon vorbereiteten 8 Tochterkerne rücken an die Oberfläche und es wölben sich kleine Höcker hervor. Plötzlich treten 4—8 langgestreckte trypanosomen-ähnliche Microgameten hervor, in denen das Chromatin durch den ganzen langgestreckten Körper verteilt ist. Das Pigment bleibt mit einem ansehnlichen Restkörper zurück (Fig. 30, 13b und 14b). Die Reifung des Macrogametocyten vollzieht sich durch Abschnürung eines Reduktionskernes (Fig. 30, 13a und 14a). Der reife Macrogamet bildet dann einen kleinen Empfängnishügel, in den je ein Microgamet eindringt (Fig. 30, 16). Wie wir sehen, schließen sich diese Verhältnisse vollkommen an die schon von *Haemoproctus* bekannten an. Wie dort, streckt sich nun auch hier die Copula zu dem wurmförmigen Ookineten.

3. Sporogonie. Der Ookinet durchbohrt im Gegensatz zu *Haemoproctus* die Darmwand und gelangt in die Tunica elasticomuscularis (Fig. 30, 18—20). Hier wird er oval und von einer cystenartigen Hülle (Oocyste) umgeben, die jedoch nicht von ihm selbst stammt, sondern einen Teil der Tunica elasticomuscularis darstellt. Innerhalb der elastischen Kapsel wächst der Parasit mächtig heran und vermehrt sich hierauf durch eine besondere multiple Teilung. Diese wird Sporogonie genannt, das zur Teilung schreitende Stadium Sporont. Das Wachstum des Sporonten geschieht in der Längsrichtung, wobei er sich unter gleichzeitiger Kernvermehrung stark aufknäuel. Auf Schnitten erscheint er in einzelne kernhaltige Plasmalelemente (Sporoblastoiden) zerfallen, doch handelt es sich nur um Querschnitte durch den aufgeknaeuelten und in die Länge gewachsenen Parasiten (Fig. 30, 21—23). Bei der weiteren Kernvermehrung rücken die Kerne an die Oberfläche der scheinbar getrennten Plasmamassen, umgeben sich mit einer dünnen Protoplasmaschicht und so entsteht eine große Anzahl von kleinen Zellen, welche sich stark in die Länge strecken und sich als Sporozoiten von den unverbrauchten Plasmaresten lösen. Die Zahl der Sporozoiten kann zwischen einigen 100 bis über 10000 schwanken. Die Sporogonie vollzieht sich unter günstigen Umständen in 8—9 Tagen. Durch Bersten der sog. Oocyste gelangen die Sporozoiten in die Leibeshöhle der Mücke und sammeln sich später in den Speicheldrüsen an (Fig. 30, 27). Mit dem Sekret der Speicheldrüse gelangen sie, wie eingangs erwähnt, in das Blut des Menschen.

Plasmodium malariae (March u. Celli).

Das *Plasmodium malariae* oder der Quartanparasit hat seinen Vulgärnamen von der Dauer der Schizogonie, die 72 Stunden in Anspruch nimmt, sodaß jeden 4. Tag ein Fieberanfall eintritt. Die jüngsten Formen sind kaum von dem Tertianparasiten zu unterscheiden. Sie sind weniger amöboid, ihre Form ist daher mehr rundlich, auch fehlt häufig die Nahrungsvacuole (Fig. 31, 1). Das Wachstum geht viel langsamer vor sich als beim Tertianparasiten. Nach 24 Stunden füllt das *Plasmodium malariae* erst etwa den vierten Teil des befallenen Erythrocyten aus (Fig. 31, 1). Charakteristisch für die Art ist auch die sog. Bandform; dabei erstreckt sich der Parasit von einer Seite der Peripherie des Blutkörperchens bis zur gegenüberliegenden. Diese Form kann schon nach

36 Stunden auftreten. Das Kernchromatin lockert sich hier sehr frühzeitig auf und verteilt sich im Liningerüst, woraus große, schwachfärbbare Kerne resultieren (Fig. 31, 2). Die erste Kernteilung kann schon 24 Stunden vor dem Anfall (also 48 nach Eindringen des Parasiten in das Blutkörperchen) beginnen, die beiden Kerne bilden, ehe sie sich weiterteilen, aufgelockerte Ruhekerne, die gleichfalls für diese Form charakteristisch sind (Fig. 31, 3). Die Zerfallsteilung geht meist regelmäßiger vor sich, wodurch sich häufig das Bild einer Margaretenblume darbietet. Die Zahl der Merozoiten ist geringer als beim Tertianparasiten, sie beträgt 6—12. Der Erythrocyt wird nicht vergrößert, der erwachsene Schizont füllt ihn vollkommen aus.

Fig. 31. Menschliches Blut mit Quartan- und Tropicaparasiten (kombiniert aus verschiedenen Präparaten). 1 Halberwachsener, 2 fast erwachsener Quartanparasit, 3 Quartanparasit nach der ersten Kernteilung, 4—6 Tropicaparasiten, 4 Ringform, 5 Macrogametocyt, 6 Microgametocyt. Zwischen den Erythrocyten einige Blutblättchen. Färbung nach Giemsa. Vergr. ca. 1200:1. Original.

der erwachsene Schizont füllt ihn vollkommen aus.

Die Gametocyten sind in ähnlicher Weise wie bei den Tertianparasiten gegenüber den Schizonten ausgezeichnet und es sei daher auf die dortige Darstellung verwiesen. Bemerken wollen wir noch, daß bei den halberwachsenen Macrogametocyten die Bandform nicht vorkommt und daß er im erwachsenen Zustande den Erythrocyten um ein Drittel seiner Größe übertrifft.

Plasmodium immaculatum (Grassi u. Fel.).

Der Parasit der tropischen Malaria oder Perniciosa unterscheidet sich von den beiden anderen Malariaparasiten des Menschen auffallend durch die Gestalt der Gametocyten, der sog. Halbmonde. Doch auch während der Schizogonie treten deutliche Unterschiede zutage. Die jüngsten Formen sind kleine Scheiben mit einer Vacuole. Diese sog. Ringformen sind wesentlich kleiner als die der beiden andern Plasmodiumarten. Der Kern ist öfter in zwei oder drei Chromatinkörner zerfallen, die später wieder zusammenfließen. Die halberwachsenen ringförmigen Stadien sind nur schwer von den Tertianringen zu unterscheiden. Doch sind die befallenen Blutkörperchen nie vergrößert oder verblaßt. Gegen Ende des Wachstums, kurz vor Beginn eines neuen Anfalles, verschwinden

die Schizonten aus dem peripheren Blut und vollenden den Abschluß der Schizogonie in den Capillaren von Milz, Hirn und Knochenmark. Der erwachsene Schizont ist etwa um ein Drittel kleiner als der von *Plasmodium vivax*. Es werden 8—25 Merozoiten gebildet.

Durch das Fehlen der Nahrungsvacuole, die geringere amöboide Beweglichkeit und das gröbere Pigment kann man auch hier ähnlich wie beim Tertian- und Quartanparasiten die jüngeren Geschlechtsformen von den Schizonten unterscheiden. Die älteren Gametocyten sind äußerst charakteristisch durch die schmale lange, an der einen Seite konkav ausgehöhlten Form (sog. Halbmond). Meist sind sie von einem zarten Rest des Erythrocyten umgeben. Die Macrogametocyten haben ein dichtes, stark blau färbbares Plasma, der kleine Kern ist von Pigment umgeben (Fig. 31, 5). Später rundet sich die halbmondförmige Form zu einem erst ovalen, dann kugeligen Körper ab.

Die Form der männlichen Halbmonde (Fig. 31, 6) ist breiter und plumper, das Plasma heller, bei Giemsa-Färbung oft violett. Das Pigment ist durch den Körper zerstreut. Der Chromatingehalt ist sehr groß und die Kernteilung in acht Tochterkerne wie bei *Haemoproteus* schon in dem scheinbar einheitlichen Mutterkern durchgeführt. Die Abrundung der Microgametocyten geschieht in der Regel erst in dem Mitteldarm des Anopheles.

Babesia canis (Piana u. Galli-Val).

Die Gattung *Babesia* zeigt in interessanter Weise einen weiteren Weg, den die phylogenetische Entwicklung der trypanosomaartigen Blutparasiten in Anpassung an den intracellulären Parasitismus eingeschlagen hat. Wir wählen zum Studium der Babesien die beim Hunde vorkommende Art, einerseits wegen der Größe, andererseits weil sie am besten studiert und am leichtesten zu beschaffen und zu halten ist.

Ist ein Hund frisch infiziert, so findet man beim ersten Fieberanstiegen in dem Blut, das dem zuvor massierten Ohrläppchen entnommen wurde, zunächst Formen, die zu einer ungeschlechtlichen, schizogonischen Vermehrung gehören. Die jüngsten Formen sind kleine freie kugelige oder ovale Zellen mit einem nach Giemsa hellroten Hauptkern und violetter kleinen punktförmigen Blepharoplast (Fig. 32 a). Diese Formen legen sich auf die Erythrocyten und sinken allmählich in sie ein. Beim weiteren Wachstum tritt eine Vacuole im Innern auf, wodurch, ganz wie bei den Malaria-Parasiten, sog. Ringformen entstehen (Fig. 32 b). Doch ist auch hierbei Kern und Blepharoplast zu unterscheiden. Dann wird der Parasit wiederum ähnlich wie die Plasmodien amöboid, wobei der Hauptkern oft sehr in die Länge gezogen wird (Fig. 32 c). Die völlig herangewachsenen Formen runden sich nun ab und Hauptkern und Blepharoplast teilen sich in der Regel zweimal (Fig. 32 d). Dann wölben sich nacheinander vier kugelartige Plasmateile vor, die je einen Kern und einen Blepharoplast enthalten, während ein großer Teil des Protoplasmas mit Kernresten als Restkörper zurückbleibt (Fig. 32 e).

Nach einiger Zeit treten die sog. Birnformen auf. Diese wachsen in ähnlicher Weise wie die Schizonten heran, nur die Formveränderlichkeit ist eine viel geringere, die Amöboidformen fehlen. Im ausgewachsenen Zustand unterscheiden sie sich durch ihre birnförmige Gestalt in sehr charakteristischer Weise von den schizogonischen Formen. Der Blepharoplast liegt stets am zugespitzten Ende der Birne.

Die Vermehrung der Birnformen geschieht durch fortgesetzte Längsteilung (Fig. 32 *f—h*), also in derselben Weise wie bei *Haemaphysalis* und *Trypanosoma*. Durch die fortgesetzte Längsteilung gehen meist 8 oder 16 Teilformen aus einem Individuum hervor, die auf einem Blutkörperchen liegen. Die gemeinsame Herkunft dieser kleinen Birnformen ergibt sich auch daraus, daß der spitze Pol bei allen nach derselben Seite gerichtet ist. Die jungen Birnformen wachsen nun zu differenzierten Geschlechts-

Fig. 32. **Babesia canis** (Piana u. Galli-Val).

a—e Schizogonie, *a* freie Form, *b* Ringform, *c* Amöboidform, *d* Kernvermehrung zur Schizogonie, *e* Bildung der Merozoiten durch Knospung, *f—h* Gametogonie, Vermehrung der Birnformen (undifferenzierte Gametocyten) durch fortgesetzte Längsteilung, *i* Doppelinfektion mit einem männlichen (rechts) und einem weiblichen (links) Gameten, *j* u. *k* Microgameten, *l* Micro- und Macrogamet, *m—o* Macrogameten, *n* Abschnürung eines Reduktionskernes, *p* Ookinet (?). Vergr. ca. 2250:1. Nach Kinoshita.

formen, Gametocyten, heran. Da die der Differenzierung der Gameten vorausgehende Vermehrung sich in anderer Weise vollzieht, wie die der ungeschlechtlichen (schizogonischen) Formen, so kann diese Vermehrung als Gametogonie (geschlechtliche Fortpflanzung) bezeichnet werden.

Die kleinen Birnformen verlassen den Erythrocyten und befallen einen neuen, um dort heranzuwachsen und sich zu Geschlechtsformen zu differenzieren. Die Differenzierung besteht darin, daß bei den männ-

lichen Formen der Blepharoplast sich sehr stark entwickelt, während der Hauptkern klein bleibt und umgekehrt bei den weiblichen Formen bleibt der Blepharoplast klein und der vegetative Kern ist stärker ausgebildet, also genau wie bei *Haemoproteus* etc. Auch im Protoplasma finden wir dieselben Verschiedenheiten wie bei jenem, das der Microgameten ist hell, hinfällig, das der Macrogameten dunkel und reservestoffreich. In Fig. 32 *i* sehen wir einen männlichen und weiblichen Gameten auf demselben Blutkörperchen. Daß dieselben nicht durch Teilung einer Birnform an Ort und Stelle entstanden, sondern erst nachträglich aufgewandert sind, ergibt sich schon aus ihrer Lage, da sie mit ungleichen Polen nebeneinander liegen.

Soweit geht die Entwicklung normalerweise im Blut des Hundes vor sich. Die weiteren Vorgänge vollziehen sich im zweiten Wirt, einer Zecke (*Hacmophysalis?*) und sind noch nicht ermittelt. Wenn man aber einen Hund im Höhepunkt der Krankheit kurz vor dem Exitus ohne Chloroform tötet und das Herzblut mit der gleichen Menge Natricum-Citricum-Lösung (2,5—5 %) versetzt, so kann man im hängenden Tropfen öfters Formen mit langen Geißeln beobachten, die sich lebhaft bewegen. Im gefärbten Präparat, das selten gelingt, da die Geißeln sehr hinfällig sind, erkennt man in ihnen die Microgameten, von deren großen Blepharoplasten aus die Geißeln entspringen (Fig. 32 *j—l*).

Gleichfalls im Herzblut verendeter Tiere sind auch Macrogameten beobachtet worden, die sich abgerundet und einen Reduktionskern ausgestoßen haben (Fig. 32 *n* und *o*). Ein weiterer Fund gleicht auffallend einem befruchteten Ookineten, wie wir ihn von *Trypanosoma*, *Haemoproteus* etc. kennen (Fig. 32 *p*). So lückenhaft diese Beobachtungen auch noch sind, so zeigen sie doch eine auffallende Übereinstimmung mit den genauer erforschten Verhältnissen bei *Trypanosoma lewisi*, *Haemoproteus* und *Plasmodium*. Ähnliche ookinetenartige Stadien sind auch bei einer anderen Art, bei *Babesia bovis*, dem Erreger des Texasfiebers beim Rinde, im Magen und Ovar des zweiten Wirtes, der Zecke *Ricicaphalus australis*, beobachtet worden.

Mit reich infiziertem Blut, das im Eisschrank aufbewahrt wird, kann man noch nach 39 Tagen mit Erfolg infizieren, es scheinen die weiblichen Formen zu sein, die im abgekugelten Zustande so lange Zeit lebensfähig sind, während die ungeschlechtlichen und männlichen Formen sehr rasch degenerieren und zugrunde gehen.

c) Spirochaeta.

Allgemeines.

Die Spirochäten bilden eine Gruppe einzelliger, flagellatenartiger Organismen, die durch die schlanke, aalartige oder spiralige Gestalt auffallen. Ob es sich um eine systematisch einheitliche Gruppe handelt und wie dieselbe im System der Flagellaten einzureihen ist, ist noch nicht entschieden. Einige Vertreter weisen zweifellos enge Beziehungen zu *Trypanosoma*-ähnlichen Flagellaten auf, manche könnten vielleicht in Anbetracht der Kernverhältnisse und geringen Größe als eine Etappe auf dem phylogenetischen Wege, der von den Flagellaten zu den Bakterien hinüberleitet, betrachtet werden.

Daß die Spirochäten echte tierische Protisten sind, geht sowohl aus ihrer ausgedehnten Flexibilität und Formveränderlichkeit bei der

Bewegung (eine Folge des Fehlens einer festen Membran, im Gegensatz zu den Spirillen) hervor, sowie aus allen bisher bekannten morphologischen und entwicklungsgeschichtlichen Verhältnissen. Von einer Form konnte nachgewiesen werden, daß sie nur ein bestimmtes Entwicklungsstadium von *Leucocytozoon ziemanni*, eines dem *Haemoproteus* nahestehenden trypanosomenartigen Blutparasiten, darstellt. Bei anderen größeren Formen läßt sich deutlich der *Trypanosoma*-artige Bau erkennen. Der Unterschied besteht neben der ungemein schlanken, an die Microgameten von *Haemoproteus* und *Plasmodium* erinnernden Gestalt, hauptsächlich in dem in Chromidien aufgelösten oder zu einem Kernstab ausgezogenen Kern, der sich durch die ganze Längsachse des Tieres erstreckt. Auch fehlt vielfach eine freie Geißel. Die undulierende Membran resp. der Randfaden derselben ist dagegen in vielen Fällen nachzuweisen, wodurch der trypanosomenartige Bau erwiesen ist. Bei den kleineren Arten ist die undulierende Membran wegen der geringen Breite der Individuen (etwa $\frac{1}{4}\mu$) oder wegen ihrer geringen Ausbildung schwer zu sehen, oft nur der Randfaden mittelst Maceration zur Darstellung zu bringen. Wenn man sich den Bau dieses Zellorgans vergegenwärtigt, wie wir ihn bei *Trypanosoma* und *Haemoproteus* kennen gelernt haben, so leuchtet ein, daß, je weniger der Randfaden ausgebildet ist, desto geringer auch die als undulierende Membran erscheinende Plasmalamelle hervortritt, bis der Randfaden, in derselben Weise wie die Periplastfasern, die auch hier vorhanden sind, direkt dem Körper anliegt und eine undulierende Membran dann schließlich völlig fehlt. Der Nachweis elastischer Fasern genügt daher an sich schon zur Auffassung der Spirochäten als flagellatenartige Protozoen (im Gegensatz zu den starren, eine feste äußere Membran besitzenden Spirillen und anderen Bakterien).

Neben den elastischen Fasern (wie bei den übrigen Flagellaten) dürfte bei den Spirochäten auch noch der Kernstab als formgebendes Element in Betracht kommen. Die Vermehrung geschieht in allen genauer untersuchten Fällen wie bei Flagellaten durch Längsteilung.

Die Spirochäten sind teils pathogene Blutparasiten, wie die *Spirochaeta obermeieri*, der Erreger des Recurrensfiebers beim Menschen, teils mehr Gewebeparasiten, wie die Syphilisspirochäte, die *Spirochaeta pallida*, teils harmlose Saprophyten, wie die Mundspirochäten etc.

Technische Bemerkungen.

Material. Zu diesem Kurs benötigen wir einige Austern, die fast stets im Magen reichlich eine große Spirochätenart, die *Spirochaeta balbianii* (Certes), enthalten. Man trennt die Schließmuskeln der Muschel, klappt die Schalenhälften auseinander, fährt mit der Platinöse in den Magen und bekommt auf diese Weise ohne weitere Präparation eine genügende Anzahl von Spirochäten.

Als zweites Untersuchungsmaterial dient uns der Zahnschleim, der mehrere Arten von Spirochäten enthält. Entnahme wie bei den Mundamöben (S. 105).

Ferner verschaffe man sich Deckglasausstriche und womöglich frische Deckglaspräparate von einem syphilitischen Primäraffekt (am besten aus dem Reizserum) und Ausstriche aus syphilitischen inneren Organen, sowie in Formol konserviertes Material von syphilitischen Organen.

Herstellung der Präparate. Zur Lebenduntersuchung bringt man das Material in einen kleinen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung, deckt mit Deckglas ab, das man sofort mit Vaseline oder Wachs umrandet, da die meisten Spirochäten streng anaërob sind. Im Leben sind die einzelnen Arten am sichersten zu unterscheiden und zwar am besten bei Dunkelfeldbeleuchtung. Bei gewöhnlicher Beleuchtung sind die feineren Arten *Sp. dentium* und *pallida* schwerer und nur mit starken Vergrößerungen (Apochr. Obj. 2 mm und Comp. Oc. 8 oder 12) zu erkennen.

Für Dauerpräparate macht man dünne Ausstriche, läßt dieselben rasch lufttrocknen werden und fixiert dann 10 Min. in absolutem Alkohol. Besser jedoch streicht man das Material auf Deckgläser ans, die vorher Osmiumdämpfen ausgesetzt waren, und bringt die Ausstriche nochmals auf einige Sekunden über Osmiumdämpfe. Hat man reichliches Material (Mundspirochäten) so empfiehlt sich auch folgende Methode: Man bringt es in einen Tropfen Osmiumsäure (1 %ig) und macht hiervon mit der Normalöse dünne Ausstriche, die man rasch hoch über der Flamme trocknet.

Die Färbung geschieht: 1. nach Giemsa (s. S. 122), Färbedauer 1—24 Stunden. Besonders für Organausstriche ist lange eventuell mehrmalige Färbedauer nötig (24 Stunden und mehr). Sehr schnell und intensiv gefärbte Spirochäten (auch *Sp. pallida*) erhält man inkl. Härtung in 3—4 Min., wenn man die Färbung durch schwaches Erhitzen des mit frischer Lösung begossenen Präparates vornimmt. 2. Geißelfärbung (vergl. hiezu S. 68) nach Löffler (nur für Ausstriche mit reinem Untergrund [Mundspirochäten und *Sp. pallida* aus Reizserum, nicht aus inneren Organen] anwendbar). Beizung mit der Löfflerschen Beize 2 Min. über der Flamme, dann tüchtige Abspülung mit Wasser. Hierauf Färbung mit Karbolfuchsin über der Flamme bis Dämpfe aufsteigen, Abspülen, Trocknen und Einbetten in Zedernöl.

Nach Giemsafärbung erscheinen die Spirochäten blau bis hellrot (*Sp. pallida*); nach Löfflers Geißelfärbung dunkelrot. In Organausstrichen (Leber, Milz etc.) ist die *Sp. pallida* häufig blasser gefärbt als der Untergrund und dann nur bei großer Übung (in dunklem Zimmer) zu sehen.

Zur besseren Darstellung der undulierenden Membran kann man statt in Osmiumsäure das Material in einen Tropfen destillierten Wassers verteilen, dann austreichen, antrocknen und fixieren, wodurch eine leichte Maceration erzielt wird.

Zur Darstellung der Spirochäten in Gewebsschnitten (spez. der *Spirochaeta pallida* in syphilitischen Organen) verfährt man nach der Silbermethode von Levaditi in folgender Weise. Man verwende dazu kleine, höchstens 2 mm dicke Organscheibchen.

1. Fixieren in Formalinlösung 24 Stunden oder länger (1+9 Wasser). Älteres und anders konserviertes Material bringt man gleichfalls 24 Stunden in frische Formalinlösung.
2. Überführen in 96 % Alkohol auf 12—16 Stunden.
3. Waschen in destilliertem Wasser, bis die Scheiben zu Boden sinken (Wasser mehrmals wechseln).
4. Imprägnieren in folgender, jedesmal frisch zu bereisender Mischung: 90 cem 1 % Silbernitratlösung + 10 cem reines Pyridin. Die Stücke bleiben darin bei Zimmertemperatur 2—3 Stunden und hierauf noch 3—5 Stunden im Thermostat bei 45—50°. (In dunkler gut 100 cem fassender Flasche mit Glasstopfen.)
5. Rasches Abwaschen in 10 % Pyridinlösung.

6. Reduktion einige Stunden oder über Nacht in folgender stets frisch zu bereitlebender Mischung von: 90 cem 4 % Pyrogallollösung und 10 cem reines Aceton. Zu 85 cem dieser Mischung noch 15 cem Pyridin.

Nach Abspülen in Wasser führt man durch Alkohol-Stufen und Xylol, bettet in Paraffin ein und fertigt Schnitte von 5—10 μ Dicke. Die Spirochäten erscheinen im Schnitt schwarz in hellgelbbraunem Gewebe.

Kultur: Die feinste der im Munde vorkommenden Spirochätenarten, die *Spirochaeta dentium*, ist auch rein kultivierbar und zwar anaërob (vergl. hiezu Übung XX, S. 62 etc.) in Serum oder Ascitesagar. Man impft mit langer Platinnadel aus einer kurz zuvor in Serumbouillon angelegten Verdünnung des Ausgangsmaterials die auf 40—42° abgekühlten Serumagarröhrchen (2 Teile Agar und 1 Teil Serum) und mischt gut; mit derselben Nadel wird noch eine weitere Verdünnung angelegt, um möglichst isolierte Kolonien in der Schüttelkultur zu erhalten. Hieran lässt man die Röhrchen sofort in kaltem Wasser erstarren. Nach 9—12tägigem Verweilen bei 37° untersucht man die verdächtigen Kolonien und macht von den event. Spirochätenkolonien Stichagarkulturen. Die Spirochätenkolonien erscheinen in den ersten Generationen erst sehr spät, nach 8—10 Tagen. Die einzelne Kolonie zeigt sich als eine äußerst feine, hauchartige, schwer sichtbare Trübung, welche bisweilen eine kleine zentrale Verdichtung erkennen lässt.

Spezieller Kurs.

Spirochaeta balbianii (Certes).

Die große Form kommt im Magen der Anster, hauptsächlich im sog. Kristallstiel vor. Die Gestalt ist schlank fadenförmig, dabei meist flach spiral gewunden und bandartig abgeplattet. Die Bewegung ist ähnlich wie bei einem *Trypanosoma* aber mehr schraubenartig schlängelnd und zwar in gleicher Weise vor- wie rückwärts. Dabei kommen starke Gestaltsveränderungen vor, die sich mit dem Ausschnellen und Zusammenziehen einer Uhrfeder vergleichen lassen und wobei die Zahl und Form der Windungen verändert werden. Auch seitlich pendelnde Bewegungen, sowie Aufrollung eines Körperendes lassen sich beobachten. Die gestreckte Gestalt, sowie die charakteristische Bewegung sind bedingt durch elastische Fasern, den Randfaden der undulierenden Membran und die Periphasenfasern.

Der Randfaden der undulierenden Membran (Fig. 33a), die hier im Leben wie im gefärbten Präparat deutlich hervortritt, setzt sich nicht in eine freie Geißel fort. Bei manchen Individuen fehlt die undulierende Membran; sie ist sehr hinfällig, der Randfaden löst sich leicht vom Körper los und kann in eine Anzahl feinerer Fasern zerfallen. An einem Ende ist der Randfaden durch einen wie Chromatin sich färbenden winkelig umgebogenen Faden (Basalkörper, Blepharoplast?), der wieder mit dem eigenartigen Kern verbunden ist, in der Zelle fixiert (Fig. 33a, c). Dadurch, sowie durch die Kernverhältnisse unterscheidet sich die Spirochäte von den Trypanosomen.

Die Kernverhältnisse sind sehr mannigfach. Im Ruhezustand bildet der Kern ein durch den ganzen Körper ziehendes spiral angeordnetes Band (Fig. 33a und b, r). Vor der Teilung sammelt sich

zunächst die chromatische Substanz zu dunkleren Körnern in regelmäßigen Zwischenstufen auf dem dadurch heller werdenden Band an (Fig. 33*b*, 2), um schließlich in einem gerade gestreckten, homogenen Kernstab wieder zusammen zu treten (Fig. 33*b*, 3). Dieser zerfällt durch Querteilung erst in stabförmige Segmente (Fig. 33*b*, 4), dann runde einreihig angeordnete Chromosome (Fig. 33*b*, 6), die sich quer zur Längsachse des Tieres in zwei Reihen von Tochterchromosomen teilen (Fig. 33*b*, 7). Bei der Teilung der Spirochäte, einer typischen Längsteilung, werden

die beiden Chromosomenreihen auf die Teilindividuen verteilt und bilden sich rückwärts wieder in derselben Weise zu einem Spiralband um. Wie bei den Trypanosomen bildet sich auch hier vor der Teilung ein zweiter lokomotorischer Apparat in den Bahnen des alten. Nach der Längsteilung bleiben die Teilindividuen öfters mit den Hinterenden unter einem Winkel von 180° im Zusammenhang und trennen sich erst später durch eine scheinbare Querteilung.

Fig. 33. *Spirochaeta balbianii* (Certes).
a Schematische Zeichnung eines gewöhnlichen Individuums.

c Chromatinfäden, welcher den Randfäden der undulierenden Membran mit dem Kern verbindet, e Randfäden der undulierenden Membran, n Kernband, p Periplast, nur als äußere Kontur gezeichnet, um Undulierende Membran.

b Schematische Darstellung von 7 zeitlich aufeinanderfolgenden Stadien der Kernveränderung bei der Teilung. Nach Perrin.

Von der *Spirochaeta balbianii* sind auch indifferente, weibliche und männliche Individuen beschrieben, doch ist die weitere Entwicklung noch nicht völlig geklärt, sodaß wir nicht näher darauf eingehen wollen.

Spirochaeta buccalis (Cohn) und *dentium* (Koch).

Im Zahnbelag des Menschen und der Tiere finden sich stets zwei (vielleicht auch mehr) Arten von Spirochäten; die größere wird *buccalis*, die kleine (auch rein kultivierbare) *dentium* genannt.

Die große *Spirochaeta buccalis* (Fig. 34*a*) besitzt flache unregelmäßige Windungen und ist an den Enden entweder abgerundet oder zugespitzt. Die Länge des bandartig abgeplatteten Körpers beträgt 12–20 μ , die Breite 0,5–1 μ (bei Löffler Färbung). Die Windungen sind häufig ziemlich regelmäßig, während der Bewegung ändern sie sich ungemein. Die Bewegungen sind die gleichen wie bei der *Spirochaeta balbianii*. Im gefärbten Präparate finden sich die verschiedensten Bewegungszustände fixiert. Eine undulierende Membran ist bei dieser Form nur manchmal zu sehen (Fig. 34*c*), doch gelingt es durch kurze Maceration vor der Geißelfärbung nach Löffler differenzierte Strukturen nachzuweisen, die so gedeutet werden können.

Manchmal finden sich an einem oder an beiden Enden geißelartige Fortsätze, vermutlich durch Ausziehen des Periplastes bei der scheinbaren Querteilung (letztes Stadium der Längsteilung) entstanden (Fig. 34 *b*).

Auch Kernbilder lassen sich bei dieser Form viel weniger sehen; gewöhnlich erscheint der ganze Körper nach Giemsa einheitlich rötlichblau gefärbt (innige Mischung von Kern resp. Chromidien und Plasma); nur selten können einmal rote Chromatinkörner im blauen Plasma bei Giemsa-Färbung beobachtet werden.

Die Teilung ist wie bei der *Spirochaeta balbianii* eine äußerst selten zu beobachtende Längsteilung mit Umlappung der Teilindividuen um 180° und erst später erfolgender, scheinbarer Querteilung, wobei die Enden, wie schon erwähnt, zu den geißelartigen Periplastfortsätzen ausgezogen werden können.

Die *Spirochaeta dentium* ist viel kleiner und feiner als die *buccalis*; sie ist in der Regel 4—10 μ lang und etwa $\frac{1}{4}$ μ dick. Diese Art weist im Gegensatz zu der *buccalis* (und übereinstimmend mit der *pallida*) auch bei der Bewegung stets regelmäßige Windungen auf. Die Windungslänge beträgt etwa 1,2 μ , die Tiefe derselben $\frac{1}{3}$ — $\frac{2}{3}$ μ in maximo. Die Ortsveränderung erfolgt durch eine Rotation um die Längsachse, nur selten kommen leichte Ausbiegungen des Körpers nach der Seite vor. In der Ruhelage sieht man außerdem lichtbrechende Stellen (undulierende Membran?) wellenartig über den Körper hinziehen, wobei im Gegensatz zur *buccalis* die Form und Zahl der Windungen erhalten bleibt.

Sehr häufig werden gegen die Enden zu die Windungen etwas flacher unter gleichzeitiger Zuspitzung des Körpers der Spirochäte. Diese Zuspitzung kann auch hier in geißelartige Periplastfortsätze übergehen (Fig. 35 *b*), was jedoch sehr selten zu beobachten ist. Von einer undulierenden Membran oder Periplastfasern, sowie von Kernverhältnissen ist bei dieser Art bis jetzt nichts nachgewiesen. Auf Grund der großen Formbeständigkeit der Art ist man wohl zur Annahme stark ausgebildeter, formbestimmender Elemente (elastische Fasern und Kernstab) gezwungen.

Die Fortpflanzung ist eine Längsteilung, doch sind unzweifelhafte Bilder äußerst selten zu beobachten. Dagegen kann man das letzte Stadium derselben, die scheinbare Querteilung der um 180° umgeklappten und zusammenbleibenden Tochterindividuen öfter zu Gesicht bekommen. Als Zwischenglieder der Teilungsvorgänge sind eventuell die gleichfalls häufiger zu beobachtenden V- und Y-förmigen Bilder zu deuten.

Fig. 34. **Spirochaeta buccalis** (Cohn). Geißelfärbung nach Löffler. *b* mit geißelartigem Periplastfortsatz, *c* mit undulierender Membran. Vergr. ca. 2400:1. Orig.

Fig. 35. **Spirochaeta dentium** (Koch). *b* mit geißelartigem Periplastfortsatz. Geißelfärbung nach Löffler. Vergr. ca. 2400:1. Orig.

Spirochaeta pallida (Schaudinn) und **refringens** (Schaudinn).

Die *Spirochaeta pallida*, der Erreger der Lues, gleicht in ihrer Morphologie sehr der *Spirochaeta dentium*. Von der in manchen oberflächlichen, syphilitischen Produkten mit ihr vergesellschafteten *Spirochaeta refringens*, die mehr der *buccalis* ähnelt, läßt sie sich leicht unterscheiden. Jene (Fig. 36) ist bedeutend dicker, stärker lichtbrechend, besitzt wenige flache Windungen, die sich bei der Bewegung stark verändern und läßt eine undulierende Membran erkennen.

Die *Spirochaeta pallida* teilt mit der *Spirochaeta dentium* die Feinheit und schwache Lichtbrechung im Leben, die geringe Färbbarkeit, die Regelmäßigkeit der kurzen Windungen und die Formbeständigkeit derselben bei der Bewegung. Dagegen ist

sie durchschnittlich länger ($10-20\ \mu$) und dabei noch dünner wie die *Sp. dentium*. Vor allem aber unterscheidet sie sich durch das ihr eigene Verhältnis von Windungslänge zu Windungstiefe und die Größe und Form des Windungswinkels von ihr.

Bei etwa gleicher Länge der Windungen beträgt nämlich ihre Tiefe in der Regel $1-1,5\ \mu$, das Verhältnis also 1:1 bis 1:1,5 (bei der *Sp. dentium* dagegen im Durchschnitt 1:0,5). Die Winkel der beiden Schenkel einer Windung sind kleiner als 90° und am Ende stark abgerundet, fast halbkreisförmig.

Geißelartige Fortsätze kommen auch bei der *Sp. pallida* vor (Fig. 37). Dieselben sind verhältnismäßig dicker als bei der *Sp. dentium* und viel häufiger zu beobachten

(bei größerer Übung auch im Leben). Die Vermehrung geschieht durch Längsteilung, wobei sich zunächst die geißelartigen Fortsätze teilen (Fig. 37a) und der Körper sich etwas verdickt. In wenigen Sekunden spaltet er sich hierauf von vorn nach hinten (Fig. 38a), während sich die beiden Tochterhälften erst durch die scheinbare Querteilung vollständig voneinander trennen (Fig. 38b). (Die eigentliche Längs-

Fig. 36. **Spirochaeta pallida** (Schaudinn) (in der Mitte) und **Spirochaeta refringens** (Schaudinn) oben und unten.
Vergr. ca. 1900:1.
Nach Schaudinn.

Fig. 37. **Spirochaeta pallida** (Schaudinn) mit geißelartigen Fortsätzen. a zwei Fortsätze an einem Ende als Beginn der Längsteilung.
Nach Schaudinn.

Fig. 38. **Spirochaeta pallida** (Schaudinn). Zwei Stadien der Längsteilung. Nach Krsyszta-lowicz u. Siedlecki.

teilung ist infolge der Raschheit des Vorganges sehr selten im gefärbten Präparat festgehalten; auch im Leben ist sie nur bei größter Übung zu sehen.)

III. Coccidia.

Allgemeines.

Die Coccidien sind sowohl wegen ihrer weiten Verbreitung bei Wirbeltieren und ihrer pathogenen Wirkung bei einigen derselben von großer Bedeutung, als auch wegen der Übereinstimmung ihres Entwicklungskreises mit dem der Plasmodien, zu deren Verständnis die Kenntnisse der leichter studierbaren Coccidien sehr wertvoll waren.

Die Coccidien sind einkernige Zellschmarotzer und zwar vorwiegend Epithelzellschmarotzer. In der durch sie hervorgerufenen, weitgehenden Zerstörung des Darmepithels dürfte die pathogene Wirkung der Coccidien schon ihre genügende Erklärung finden. Sie besitzen infolge des Mangels von elastischen, formbestimmenden Elementen meist runde oder ovale Gestalt. Nur die freien Jugendformen und die Microgameten haben längliche Gestalt und sind aktiver Bewegung fähig. Die Autoinfektion vollzieht sich durch einen agametischen multiplen Teilungsprozeß, die Schizogonie. Die Neuinfektion durch Oocysten, die aus einer Befruchtung hervorgegangen sind und in denen eine zweite Art der Fortpflanzung, die Sporogonie, vor sich geht. Der ganze Entwicklungskreis läßt sich am besten an der Hand eines speziellen Beispiels klarlegen. Wir wählen hierzu *Eimeria schubergi* (Schaudinn), ein Darmparasit des gewöhnlichen Tausendfuß, *Lithobius forficatus*. (Vergl. hiezu Fig. 39.)

Die durch Plätzen der Oocyste (XX) im Darm des neuen Wirtes freige gewordenen Sporozoiten (I), die ähnliche Bewegungen auszuführen vermögen wie die Sporozoiten der Hämosporidien, dringen mit Hilfe ihres zugespitzten, dichteren Vorderendes in die Darmepithelzellen des Wirtes ein (II) und werden hier zu dem ovalen, später kugeligen, jungen Schizonten (III, IV). Dabei bildet sich im Kern aus zerstreuten Chromatinkörnern und aus Plastinsubstanz ein großer Binnenkörper (Caryosom). Am Schlusse des Wachstums teilt sich der Kern des Schizonten durch fortgesetzte primitive Mitosen in eine Anzahl Tochterkerne (V, VI). An jedem Kern wölbt sich ein Buckel von flüssigem Protoplasma hervor, während sich im Centrum dichteres Protoplasma ansammelt. Um diese Zeit fällt gewöhnlich der Schizont aus der Epithelzelle heraus in das Darmlumen. Er zerschnürt sich hierauf in so viele Teilstücke, als Kerne gebildet wurden; das centrale dichtere Protoplasma bleibt als Restkörper zurück (VII).

Dieser durch entstandenen Tochterindividuen, die Merozoiten (VIII), sind den Sporozoiten äußerst ähnlich, unterscheiden sich aber von ihnen hauptsächlich durch den Besitz eines Caryosoms. Sie dringen wie sie in neue Epithelzellen ein und wachsen dort wieder zu Schizonten heran.

Fig. 39. Entwicklungskreis von **Eimeria schubergi**. Nach Schaudinn aus Lang. Erklärung im Text.

Durch diese fortgesetzte Schizogonie wird die Zahl der Parasiten in dem einmal infizierten Wirt ungeheuer vermehrt; aber schließlich findet der Fortpflanzungsprozeß ein Ende und die Merozoiten werden nicht mehr zu Schizonten, sondern entwickeln sich zu weiblichen, resp. männlichen Gametocyten (IX, X). Dieselben unterscheiden sich ähnlich wie die Geschlechtsformen bei den Blutparasiten, indem die Macrogametocyten ein grobgranuliertes, dichtes, reservestoffreiches Protoplasma, die Microgametocyten ein klares, feinwabiges aufweisen (XIb n. XIIb).

Auch die Weiterentwicklung der Geschlechtsgeneration und die Befruchtung verhält sich ganz ähnlich wie bei den schon beschriebenen Blutparasiten, jedoch mit dem Unterschied, daß diese Vorgänge im Darm desselben Wirtes sich abspielen, also ohne Wirtswechsel. Die Reifung des Macrogametocyten vollzieht sich unter gleichzeitiger kugeliger Abmündung der vorher meist bohnenförmigen Zelle durch eine Kernreduktion, wodurch ein einziger Macrogamet entsteht (XIc), während der Microgametocyt in eine größere Anzahl von Microgameten zerfällt (XIc, d). Diese besitzen zwei Geißeln, je eine am Vorder- und Hinterende und bestehen fast ausschließlich aus Kernsubstanz mit einer geringen Protoplasmamenge; sie sind außerordentlich beweglich (XIie).

Sobald die weibliche Geschlechtszelle durch Ausstoßung von Kernbestandteilen ihre Reife erlangt hat, wird sie von Microgameten, auf die sie eine Anziehungskraft ausübt, ungeschwärmt. In einen kleinen vorgewölbten Höcker, den sog. Empfängnishügel (XIII), dringt ein Microgamet ein und sobald dies geschehen ist, wird eine Membran an der Oberfläche ausgeschieden und der Macrogamet wird dadurch zu Oocyste. Die hierauf folgende Kernverschmelzung oder Caryogamie vollzieht sich unter dem Bilde der Copulationsspindel (XIV), die wir ebenfalls schon von *Haemophysalis* her kennen.

Innerhalb der Oocyste folgt dann die zweite Art der Fortpflanzung, die Sporogonie (XVI—XX). Der wieder zur Ruhe gekommene Copulationskern teilt sich zweimal hintereinander in vier Tochterkerne (XVI, XVII) und das Protoplasma zerfällt unter Zurückbleiben eines Restkörpers entsprechend in vier Tochterzellen, die Sporoblasten. Durch Ausscheidung doppelter Hüllen werden diese vier Sporoblasten zu Sporocysten (XVIII), innerhalb denen durch eine weitere Teilung je zwei Sporozoiten und ein Restkörper entstehen (XIX). Die Oocysten werden mit den Fäkalien entleert und dienen in der anfangs beschriebenen Weise der Neuinfektion. Damit ist der Zeugungskreis geschlossen.

Technische Bemerkungen.

Material. Zu diesem Kurs gebraucht man mit Coccidien infizierte Kaninchen, die man in jeder Kaninchenzucht finden kann und deren Infektion an dem Vorhandensein von Coccidiencysten im Stuhl zu erkennen ist. Die Schizogoniestadien fehlen dann allerdings in der Regel. Da es schwer ist, überhaupt uninfizierte Kaninchen zu bekommen, um an ihnen Neuinfektion vornehmen zu können, wodurch die erwünschten Stadien leicht zu erhalten wären, so ist man meistens darauf angewiesen, konserviertes Dünndarm- und Lebermaterial, das diese Stadien enthält und das man ev. bei gelegentlichen Sektionen gesammelt hat, verarbeiten zu lassen. Die Leberknoten, die noch Schizogoniestadien enthalten, erkennt man daran, daß der Inhalt der Coccidienherde hier noch so flüssig

ist, daß er bei der Öffnung von selbst herausläuft. Herde mit verkästem Inhalt haben fast nur Sporogoniestadien.

Zur Lebenduntersuchung von Schizogonie und Geschlechtsstadien zerpupft man kleine Flöckchen Dünndarmschleimhaut auf dem planen Objekträger und schließt rasch ohne Zusatz fremder Flüssigkeit durch Deckglas und Wachs- oder Vaselineumrandung von der Luft ab. Die Sporogonie vollzieht sich dagegen nur unter Luftzutritt. Man kann dieselbe in einer feuchten Kammer im Leben verfolgen (mit mittelstarken Trockenlinsen), wobei es zweckmäßig ist, zur Vermeidung der Wucherung von Fäulnisbakterien das oocystenhaltige Material zuvor mit einem Antiseptikum, z. B. 4% Kaliumbichromatlösung, zu behandeln, was die Oocysten in keiner Weise schädigt.

Für Dauerpräparate fertigt man Deckglasausstriche von Darm- und Lebermaterial und Schnitte von Darm- und Leberstückchen. Konservierung der Ausstriche und Organstücke wie bei den Amöben (s. S. 106) mit heißem Sublimat-Alkohol. Dünndarmstücke von etwa 2 cm Länge bindet man an einem Ende ab, füllt mittelst Pipette den Hohlraum mit der Konservierungsflüssigkeit, bindet rasch das obere Ende ab und legt das so hergerichtete Stück in die Konservierungsflüssigkeit ein.

Zur Färbung eignet sich besonders für Cysten stark verdünntes Grenachers Hämatoxylin (Färbungsdauer ca. 24 Stunden) und ev. Nachfärben mit Eosin. Auch Heidenhains Hämatoxylin empfiehlt sich und zwar besonders bei Schnitten. Hier stark Entfärben mit Eisenalaun und Nachfärben mit Bordeauxrot, worauf die Kerne schwarz, die sonst schwer davon zu unterscheidende Granula rot gefärbt erscheinen.

Spezieller Kurs.

Eimeria stiedae (Lindem.).

Mit dem Bau und der Entwicklung der Coccidien wollen wir uns an der für die Medizin wichtigsten Form, der *Eimeria stiedae* aus Dünndarm und Leber von Kaninchen bekannt machen, dem Erreger der Kaninchenoccidiose und der sog. roten Ruhr der Rinder. Sie stimmt im großen und ganzen mit der als Typus geschilderten *Eimeria schubergi* überein.

Fig. 40. **Eimeria stiedae** (Lindem.) Schizogonie. Nach Simond aus Doflein.

Falls man frisch infizierte Kaninchen mit Schizogoniestadien zur Verfügung hat, kann man diese Verhältnisse auch am lebenden Objekt studieren. Im allgemeinen ist man aber auf die Untersuchung von Ausstrichen und Schnittpräparaten angewiesen. Die jungen Schizonten sind an ihrer starken Lichtbrechung in vivo leicht von den sie beherbergenden Epithelzellen des Wirtstieres zu unterscheiden. Die Teilung

des Kernes kann in den verschiedensten Wachstumsstadien beginnen und zwar schon sehr frühzeitig. Die Schizogonie vollzieht sich wie bei *Eimeria schubergi*, bei welcher letzterer sie jedoch leichter zu beobachten ist. Die Merozoiten sind meist bündelförmig angeordnet (Fig. 40). Zahl und Größe derselben sind sehr wechselnd.

Bei Untersuchung frisch getöteter Kaninchen kann man (bei reichlichem Vorhandensein reifer Schizonten) die Merozoiten ev. lebend mit ihren charakteristischen Bewegungen studieren. Dieselben bestehen wie bei den Gregarinen einerseits in gleitendem Vorwärtsschieben, andererseits in Biegungen, Streckungen und Kontraktionen des Körpers. Die Geschlechtsformen, besonders ihre Entwicklung und Reifung, sind hier ebenfalls nicht so genau bekannt wie bei *Eimeria schubergi*.

Die Kernvermehrung der Microgametocyten beginnt sehr frühzeitig; die Zahl der Microgameten, die um einen ansehnlichen Restkörper angeordnet sind, ist sehr groß. Ihre Größe beträgt etwa die Hälfte von der der Microgameten von *Eimeria schubergi*. Die zwei Geißeln entspringen im Gegensatz zu jenen beiden am Vorderende.

Die ausgebildeten Microgameten sind im Leben in lebhafter Bewegung noch innerhalb der Membran des Microgametocyten zu beobachten.

Die Macrogametocyten unterscheiden sich von den Schizonten und Microgametocyten durch die charakteristischen Granulationen, worunter chromatoide und plastische Granula unterschieden werden. Erstere liegen an der Peripherie, sind stark färbbar und können event. Kerne vortäuschen. Die oben angegebene Färbung mit Eisenhämatoxylin und Bordeauxrot, sowie der Nachweis eines großen centralen Kernes schützen vor Verwechslung mit vielkernigen Microgametocyten. Die chromatischen Granulationen sind vermutlich somatische Chromidien, die plastischen, die sich nicht mit Kernfarbstoff färben, stellen Reservestoffe dar.

Die Befruchtungsvorgänge sind von unserer Form noch nicht bekannt. Wir wenden uns daher sogleich der Sporogonie in der befruchteten Oocyste zu.

Diese Vorgänge sind am leichtesten zu beobachten und können sogar am selben Individuum im Leben verfolgt werden. Die befruchteten Macrogameten, die hier ovale Gestalt besitzen, scheiden an der Oberfläche eine doppelt konturierte Membran aus. Die Größe und Form der Cysten ist außerordentlich verschieden bei den Darm- wie bei den Leberformen. Der eine, spitzere Pol ist abgeflacht und die Membran an dieser Stelle verdünnt. Es handelt sich hierbei um eine Micropyle, durch die später die Keime frei werden. Die Bildung der Membran steht vermutlich mit den chromatischen Granula des Macrogameten in Zusammenhang. Die Membran wird von einer schleimigen Hülle umgeben, die an der Micropyle verdickt erscheint (Fig. 41 a). Später geht diese Hülle verloren. Der Inhalt der Oocyste, der anfangs diese ganz ausfüllte, zieht sich bald darauf zu einer Kugel zusammen, die nur im Äquator die Cyste berührt (Fig. 41 a). Der übrige Teil derselben ist alsdann durch eine gallertige Substanz erfüllt, die sich später verflüssigt. Die Copula oder der Sporont erscheint im Leben als stark granuliert grünliche Zelle. Im Centrum ist ein heller Fleck in zartrosa Ton zu beobachten, der Kern.

Die Weiterentwicklung vollzieht sich nur außerhalb des Wirtes bei Sauerstoffzutritt. Wir beschränken uns auf die Lebenduntersuchung, da Färbungen sehr schwer gelingen. Nach etwa 30 Stunden zeigt der kugelige Sporont vier buckelartige Auftreibungen, um sich dann weiterhin innerhalb ca. 40 Minuten in vier kugelige Zellen zu zerschnüren, die Sporoblasten (Fig. 41 b u. c). Die dem Zerfall vorausgegangene doppelte Teilung des Kernes ist nicht im Leben zu beobachten. Der Kern ver-

schwindet und erst beim Erscheinen der vier Buckel können später die vier Tochterkerne wahrgenommen werden. Zwischen den Sporoblasten findet sich ein kleinerer oder größerer granulierter Restkörper, der meist durch die Sporoblasten verdeckt wird. Im weiteren Verlaufe bildet jede der vier Tochterzellen einen pyramidenförmigen Fortsatz und stemmt ein stark lichtbrechendes Spitzenkörperchen aus, dessen Bedeutung unbekannt ist. Nach Ausstoßung derselben wird die Pyramide wieder rück-

gebildet und der frühere Zustand

kurze Zeit wieder erreicht. Die

Sporoblasten nehmen hierauf eine ovale, dann birnförmige Gestalt an und scheiden an der Oberfläche eine

Membran ab. Dadurch werden sie zu Sporocysten. Der spitze Pol ist durch ein nach innen vor-

springendes Körperchen, die Micropyle, gekennzeichnet. Der Zellinhalt

Fig. 41. *Eimeria stiedae* (Lindem.) Sporogonie.
a—c Bildung der Sporoblasten, d reife Oocyste mit ausgebildeten Sporozoiten, e Freiwerden der Sporozoiten unter Einwirkung von Pankreassaft. Nach Metzner.

der Sporocysten zerfällt dann in zwei Tochterzellen, die Sporozoiten, zwischen denen gleichfalls ein Restkörper übrig bleibt. An den Sporozoiten ist das eine Ende stark verdickt und enthält eine eiförmige, glänzende, homogene Masse. Das vordere zugespitzte Ende ist innerhalb der Sporocyste weniger gut zu erkennen. In letzterem liegt auch der Kern. Dieses Stadium wird nach etwa 70 Stunden erreicht (Fig. 41 d).

Durch die Oocysten mit den fertigen Sporozoiten läßt sich die Neuinfektion vollziehen. Die Oocysten passieren den Magen und erst im Darm durch die Einwirkung des Pankreassaftes werden die Sporozoiten aus der Sporocyste und Oocyste frei. Man kann dies künstlich herbeiführen und dabei event. das Ausschlüpfen der Sporozoiten durch die Micropyle beobachten, wenn man reifes Oocystenmaterial einige Stunden im Thermostat in ein Röhrchen mit Duodenalsaft eines Kaninchens oder mit einem Pankreaspräparat (am besten Pancreat depuratum, von

Dr. Grübler, Leipzig) bringt und Präparate davon anfertigt. Der Sporozoit schlüpft zunächst aktiv durch die Micropyle der Sporocyste, darauf durch die Oocyste (Fig. 41 c). Der freie Sporozoit zeigt die gleichen Bewegungsarten wie die Merozoiten, im Verdauungssaft wird er bald aufgelöst. Im Darm sucht er sofort eine Epithelzelle zu erreichen und dringt durch Körperkontraktionen in ähnlicher Weise wie die Merozoiten in sie ein.

IV. Gregarinida.

Allgemeines.

Obwohl die Gregarinen keine pathogenen Arten enthalten und fast ausschließlich Parasiten der Wirbellosen sind, sollen sie hier doch nicht übergangen werden, weil gewisse Bau- und Entwicklungsverhältnisse, so z. B. Befruchtungsvorgänge, sehr leicht beobachtet werden können und diese teils von allgemeinem Interesse sind, teils wegen der nahen Verwandtschaft mit Coccidien und Hämosporidien sehr zum morphologischen Verständnis des Baues dieser Protozoenformen beizutragen vermögen.

Die Gregarinen sind im Gegensatz zu den Coccidien Bewohner von Körperhöhlen und leben nur im Jugendzustande teilweise oder ganz intrasp. intercellulär. Die ausgewachsenen Individuen haben zuweilen beträchtliche Größe und sind schon mit schwacher Vergrößerung (Objektiv A. Zeiss) ja selbst mit bloßem Auge erkenntlich. Ihre Form ist länglich, abgeplattet, ähnlich der der Ookineten der Hämosporidien, mit denen sie auch bezüglich der Bewegung übereinstimmen. Letztere kann bei den Gregarinen sehr leicht studiert werden. Ein Vorder- und Hinterende ist meist deutlich ausgebildet.

Die Gestalt wird bedingt durch eine vom Ectoplasma ausgeschiedene Cuticula, die meist Längsfurchen aufweist. Bei den niederen Formen (Monocystiden) ist sie gering ausgebildet, weshalb ihre Gestalt innerhalb gewisser Grenzen veränderlich ist (metabol).

Der nur wenig bewegliche Körper der höheren Formen (Polycystiden) ist in zwei resp. drei deutlich erkennbare Zellabschnitte eingeteilt, den Epimerit (vorderen), den Protomerit (mittleren) und den Deutomerit (hinteren). Letzterer, der Hauptteil, enthält den Kern. Proto- und Deutomerit sind durch eine konstante Ectoplasmaschicht voneinander getrennt. Der Epimerit ist meist mit besonderen cuticularen Festhaltungsorganellen (Zähnen, Widerhaken etc.) ausgestattet und geht unmittelbar in den Deutomerit über. Bei den erwachsenen freien Formen geht er in der Regel verloren.

Zwischen Cuticula und Ectoplasma kann noch eine besondere Gallertschicht vorhanden sein, die bei der Bewegung eine Rolle spielt. Im eigentlichen Ectoplasma und zwar an der Grenze gegen das Entoplasma finden sich in der Regel ringförmig um den Körper ziehende, muskelfibrillenartige Fasern.

Die Körperbewegung besteht in wellenartig von einem Körperende zum andern verlaufenden Kontraktionen und in plötzlichen seitlichen Knickungen, wobei die Fibrillenschicht im Ectoplasma eine Rolle spielt. Die eigentliche Ortsveränderung erfolgt jedoch durch ein eigentümliches Gleiten ohne sichtbare Gestaltsveränderung. Sie wird auf die Ausscheidung eines erstarrenden Gallertstieles am Hinterende zurückgeführt.

Das Entoplasma, das trübe und starkkörnig ist, enthält verschiedene Granulationen, die Reservestoffe darstellen; die wichtigsten sind große ovale oder kugelige Körner aus Paraglykogen.

Der stets in der Einzahl vorkommende Kern ist groß, bläschenförmig und enthält einen großen, stark chromatischen Innenkörper (Caryosom), der im vegetativen Leben mannigfache Veränderungen erfahren kann.

Häufig kommen Verklebungszustände vor, indem sich die einzelnen Individuen mit den ungleichen Polen aneinander hängen und so ganze Ketten bilden. Mit Fortpflanzungs- oder Befruchtungsvorgängen, wie man früher geglaubt hatte, hat diese Erscheinung nichts zu tun.

Die Fortpflanzungs- und Befruchtungsvorgänge, die sich in einer Cyste abspielen, werden wir im speziellen Kurs kennen lernen.

Technische Bemerkungen.

Material. Zum Studium der Gregarinen wählen wir die in den Samenblasen des Regenwurmes vorkommenden Arten, die der Gattung *Monocystis* angehören. Man

Fig. 42. **Lumbricus herculeus**. Anatomie des Vorderendes.
Aus Kükenthal.

betäubt die Regenwürmer in Chloroform und steckt sie im Präparierbecken mit der dunklen

Rückenseite nach oben fest. Mittelst feiner Schere macht man von hinten nach vorn, der

Mitte des Rückens entlang einen Hautschnitt, trennt die Seitenwände mit einem feinen Skalpell von den sie fest-

haltenden

Dissepidanten rechts und links ab und steckt sie mit Nadeln fest (Fig. 42).

Im 10., 11. und 12. Segment fallen drei Paar anscheinliche, weißgelbliche Blasen auf, die sog. Samenblasen, die zahlreiche Spermatozoen und am häufigsten in den Sommermonaten (Mai und Juni am günstigsten) meist encystierte seltener freie monocystide Gregarinen enthalten.

Zur Lebenduntersuchung der Gregarinen zerzupft man ein Stückchen Samenblase ev. in einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung, legt ein Deckglas auf und untersucht zunächst mit schwacher Vergrößerung.

Zur Herstellung von Dauerpräparaten fertigt man sowohl Deckglasaussstriche, vor allem aber Schnitte durch ganze Samenblasen.

Zur Konservierung dient Sublimat-Alkohol oder Hermannsche Flüssigkeit, zur Färbung der Ansstriche Boraxkarmin oder Grenachers resp. Delafields Hämatoxylin, der Schnitte vornehmlich Eisen-Hämatoxylin (ev. Nachfärben mit Bordeauxrot oder Lichtgrün).

Enthalten die Samenblasen der Regenwürmer keine freien Gregarinen, so untersuche man Küchenschaben oder Mehlwürmer auf solche, wo sich im Darm in der Regel reichlich freie polycystide Formen finden.

Spezieller Kurs.

Monocystis spec.

In den auf obige Weise hergestellten Präparaten aus den Samenblasen des Regenwurmes findet man schon mit schwacher Vergrößerung (etwa Objektiv A. Zeiss) große kugelige Cysten, ev. vereinzelt freie Gregarinen (Fig. 43). Letztere sind langgestreckte schmale Zellen mit einem großen Kern im vorderen Körperteil. Die Oberfläche scheint oft wie mit Cilien besetzt, doch handelt es sich nur um ansitzende Spermatozoen (Fig. 43). Eine Trennung des Körpers in Proto- und Deutomerit ist nicht vorhanden, das bildet das Hauptcharakteristikum der Gattung *Monocystis*. Die im Regenwurmhoden vorkommenden Gregarinen gehören verschiedenen Arten der Gattung *Monocystis* an, die sich im vegetativen, freien Stadium unterscheiden lassen. Da sie aber im encystierten Zustand nicht gut auseinander zu halten sind und die freilebenden Formen relativ selten zur Beobachtung gelangen, so wollen wir auf die Unterscheidungsmerkmale der einzelnen Arten verzichten.

Fig. 43. **Monocystis spec.** Zwei aneinanderliegende freie Gregarinen. Beginn der gemeinsamen Encystierung. Vergr. 37:1. Nach Cuénot.

Fig. 44. **Monocystis spec.** Junge Cyste mit zwei Individuen. Vergr. 37:1. Nach Cuénot.

Die häufig zur Beobachtung gelangenden Cysten

finden wir mit den verschiedensten Stadien der Gametenbildung (Gametogonie) Befruchtung und darauffolgenden Sporogonie. Die sich dabei abspielenden Vorgänge, die hier der Reihe nach beschrieben werden sollen, können in den Präparaten zum großen Teil meist nebeneinander beobachtet werden; dabei sind selbst Details am lebenden Präparat gut zu erkennen. Man suche die einzelnen Stadien möglichst in der richtigen Reihenfolge bei schwacher Vergrößerung auf und studiere sie hierauf genauer mit der Immersion.

Als Vorbereitung zur Encystierung legen sich zwei freie Gregarinen mit den Längsseiten aneinander (Fig. 43), runden sich ab und scheiden eine gemeinsame Hülle aus (Fig. 44). Der Kern einer jeden löst sich nun auf. Der größte Teil des Inhaltes (Caryosom) wird als rein somatisches Material zerstreut, aus einem kleinen Teil bildet sich ein neuer kleiner Geschlechtskern, der sich sofort caryokinetisch teilt. Durch weitere fortgesetzte Mitosen (Fig. 45 A) entsteht eine große Anzahl kleiner Kerne, die an die Peripherie wandern (Fig. 45, B, C). Daraus entstehen kleine Zellen, indem sich um jeden Kern eine kleine Portion Protoplasma abfurcht (Fig. 45, B—D), während der größte Teil der früheren Gregarine als degenerierender, unregelmäßiger, meist grobvacuolisierter Restkörper übrigbleibt, der auch das degenerierende somatische Chromatin (bei anderen Formen ausgebildete somatische Kerne) enthält (Fig. 45, B, C, D).

Fig. 45. **Monocystis agilis** F. Stein und **magna** Schmidt (aus dem Regenwurmhoden). Verschiedene Stadien der Gametenbildung. A Schnitt durch zwei Individuen nach erfolgter Encystierung. Im oberen Individuum sieht man eine Mitose und 5 mitotisch entstandene Kerne. B und D Fortgeschrittene Stadien der Gametenbildung. C Fragment der Oberfläche (schematisch). Die Gameten im Begriffe sich zu individualisieren. 2 Kerne, 4 äußere, 5 innere Cystenhülle, 6 Restkörper. Nach Wolters aus Lang.

Die an der Oberfläche entstandenen Zellen sind Gameten und zwar in diesem Falle Isogameten (bei anderen Formen gibt es ausgesprochen männliche und weibliche Gameten). Die vorausgegangene Vermehrungsweise ist daher eine geschlechtliche Fortpflanzung, eine Gametogonie. Die Reduktion der chromatischen Substanz ist hier noch nicht ermittelt, bei anderen Arten vollzieht sie sich durch die beiden letzten zur Gametenbildung führenden Kernteilungen, wodurch die Zahl der Chromosomen auf die Hälfte reduziert wird. Je zwei Isogameten, die aber von verschiedenen Elterntieren abstammen, verschmelzen nun zusammen (Fig. 46 a—c) und zwar zunächst nur das Protoplasma, dann die Kerne (Caryogamie, Fig. 46 c, d). Die so entstandene Copula

oder Zygote wird spindelförmig, umgibt sich hierauf mit einer doppelten Hülle und wird dadurch zur Sporocyste oder Pseudonavicelle (Fig. 46 f.) Der Inhalt der Sporocyste, der Sporoblast, zerfällt, nachdem sich der Kern auf mitotischem Wege auf acht Tochterkerne vermehrt hat, in die gleiche Anzahl segmentweise angeordneter Sporozoiten unter Hinterlassung eines kleinen Restkörpers. Innerhalb der Gregarinenzyste vollzieht sich also einerseits die Gametogonie, d. h. die Ausbildung der Gameten und die Befruchtung und andererseits eine ungeschlechtliche Vermehrung in der Sporocyste, die der Sporogonie der Coccidien entspricht.

Der große Restkörper, der bei der Bildung der Gameten zurückgeblieben ist und aus Protoplasma und degenerierendem somatischem Kernmaterial besteht, kann durch sein großes Quellungsvermögen unter besonderen Verhältnissen die

Fig. 46. *Monocystis* spec. Befruchtung und Sporogonie. a—c Verschmelzung der Isogameten, d und e Caryogamie, f—h Bildung der 8 Sporozoiten in der Sporocyste (Sporogonie). Vergr. ca. 1200:1. Nach Cuénot.

Cyste sprengen und dadurch die Entleerung der Sporocysten bewirken.

Wie schon erwähnt, können schon am lebenden Objekt Vorgänge der Gametogonie und Befruchtung beobachtet werden, besonders bei guter Orientierung der Cysten, die man durch Rollen des Deckglases erzielen kann. Die Kernteilung bei der Gametogonie und Sporogonie muß an Schnittpräparaten studiert werden.

Die reifen Sporocysten gelangen entweder beim Entleeren der Geschlechtsprodukte oder aber (meistens) erst nach dem Tode der Regenwürmer ins Freie und vollziehen die Neuinfektion.

V. Ciliata.

Allgemeines.

Die Ciliaten sind in vieler Beziehung die höchstdifferenzierten Formen unter den Protozoen, die mit den verschiedensten Organellen ausgestattet sein können. Ihr hervorstechendstes Merkmal, das ihnen auch den Namen gegeben hat, ist die große Anzahl von Wimpern oder Cilien, die in mannigfachster Weise angeordnet sind und dadurch wichtige Anhaltspunkte für die Systematik der Ciliaten abgeben. Sie dienen der Bewegung und Nahrungsaufnahme, besitzen wie die Geißeln der Flagel-

laten einen vermutlich elastischen Achsenfaden und eine dünne protoplasmatische Hülle und sind durch Basalkörper im Ectoplasma inseriert.

Die Ciliaten haben sämtlich eine bestimmte Körpergestalt, die durch eine Verdickung und Erhärtung der Zelloberfläche bedingt ist, der sog. Pellicula. Die ametabolen Formen sind vollkommen unveränderlich infolge panzerartiger Festigkeit der Pellicula. Die metabolen Formen mit biegsamer Pellicula können, wenn sie auf Hindernisse stoßen, ihre Gestalt verändern, kehren jedoch darnach wieder zur normalen Gestalt zurück.

Zur Nahrungsaufnahme ist gewöhnlich ein mehr oder minder kompliziert gebauter Zellmund (Cytostom) ausgebildet, meist eine trichterartige Einsenkung der Oberfläche (Pellicula und Geißeln) ins Körperinnere. Am Grunde der Einsenkung fehlt die Pellicula und hier wird die hineingestrudelte, feste Nahrung ins Protoplasma aufgenommen und in Nahrungsvacuolen eingeschlossen. Vielfach besitzen die Ciliaten auch einen vorgebildeten Zellafter (Cytopyge), durch den die unverdauten Nahrungsreste entleert werden. Contractile Vacuolen sind in der Regel vorhanden und zwar konstant in Zahl und Lagerung.

Stets finden sich bei den Ciliaten zwei physiologisch verschiedene Kerne, ein großer intensiv färbbarer Macronucleus oder Großkern und ein kleiner Micronucleus oder Kleinkern. Letzterer ist der Geschlechtskern, ersterer der somatische Kern. Der Kerndualismus ist hier also dauernd. Macro- und Micronucleus sind entweder in der Einzahl oder zu mehreren vorhanden.

Die Fortpflanzung ist stets eine Querteilung, wobei sich zuerst der Micronucleus durch eine eigentümliche Mitose teilt, hierauf der Macronucleus durch einfache Zerschnürung. Vielfach werden die Zellorganoide, Zellmund, After, contractile Vacuole etc. von einem Kindindividuum übernommen und nur in dem andern neugebildet, z. T. schon vor der Teilung, in andern Fällen werden sie vor der Teilung eingeschmolzen und dann in beiden Kindindividuen neu gebildet.

Die Befruchtung ist stets eine Conjugation (s. Allgemeiner Teil S. 102), was zusammen mit dem Kerndualismus das wichtigste Merkmal der Klasse der Ciliaten vorstellt. Bei der Conjugation geht der somatische Macronucleus zugrunde und wird nach der Caryogamie aus den Syncarien durch mannigfache Teilungen wieder neu gebildet. Die Bildung von einfachen Schutzcysten (ohne weitere Beziehung zur Fortpflanzung und Befruchtung) ist sehr verbreitet.

Technische Bemerkungen.

Material. Wir beschränken uns auf das Studium der Ciliatenformen, die wir im Enddarm und der Cloake unserer Frösche finden und die den beim Menschen vorkommenden sehr nahe stehen. Bei Öffnung des Enddarmes eines Frosches kann man in der Regel schon mit bloßem Auge weißliche, lebhaft bewegliche Pünktchen erkennen. Zur Lebenduntersuchung bringt man mit einer Öse etwas Darminhalt in einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung. Da die Ciliaten ihrer heftigen Bewegung wegen die Beobachtung sehr erschweren, empfiehlt es sich, eine schwache Gelatine- oder Kirschbaumharzlösung zuzusetzen, um das Medium zu verdicken.

Für gewöhnliche diagnostische Zwecke genügt neben der Lebenduntersuchung die Herstellung von Deckglasausstrichen, die man in der

bekannten Weise sofort auf heißer Hermannscher Flüssigkeit oder Sublimat-Alkohol fixiert und mit Boraxkarminlösung färbt.

Zum Studium der feineren Kern- und Plasmaverhältnisse reichen die Totalpräparate nicht aus, man muß daher Schnitte herstellen. Am besten zentrifugiert man dazu eine größere Menge von Parasiten sofort in der Fixierungsflüssigkeit aus (s. bei den Binucleata S. 122) und behandelt unter jedesmaliger Zentrifugierung weiter bis zur Einbettung. Die aufgeklebten Schnitte färbt man am besten mit Heidenhains Eisenhämatoxylin.

Spezieller Kurs.

Opalina ranarum (Purkinje u. Valentin).

Untersuchen wir Enddarm und Cloake des Frosches auf Parasiten, so fallen uns vor allem große, an der ganzen Oberfläche mit gleichmäßigen Cilien bedeckte Zellen in die Augen. Dieselben gehören der Gattung *Opalina* an. Obwohl sie, wie durch neuere Studien festgestellt ist, nicht den Ciliaten zuzurechnen sind, wollen wir sie doch wegen des auffälligen Vorkommens und ihrer äußeren Übereinstimmung mit echten

Fig. 47. **Opalina ranarum** (Purkinje u. Valentin).

a erwachsenes Tier mit zahlreichen bläschenförmigen Kernen, *b* das gleiche in schiefe Zweiteilung begriffen, *c* durch fortgesetzte Teilung entstandenes kleines wenig kerniges Individuum (Gamont), *d* ein solches encystiert. Aus Doflein nach Zeller.

Ciliaten an dieser Stelle kurz erwähnen. Die häufigste Form, *Opalina ranarum*, ist ziemlich groß (500—800 μ). Der Körper ist stark abgeplattet, nach vorn etwas verjüngt, hinten abgerundet (Fig. 47a). Die linksseitige Kontur ist leicht eingekerbt, die Oberfläche deutlich schräg gestreift. Im Entoplasma findet sich eine große Anzahl bläschenförmiger gleichartiger Kerne, die in vivo als stärker lichtbrechende Scheiben erscheinen. Mund, After und contractile Vacuole fehlen. Die Vermehrung der erwachsenen Form erfolgt durch eine meist schiefe Zweiteilung (Fig. 47b).

Die Gattung wurde bisher auf Grund ihrer gleichmäßigen Bewimperung zu den holotrichen Ciliaten gestellt, obwohl der Bau der Kerne und das Fehlen der Doppelkernigkeit sie von allen übrigen Ciliaten trennt. Neuerdings hat sich herausgestellt, daß der Organismus in seiner Entwicklung, bei der eine Copulation kleiner Isogameten vorkommt, sich ganz an die Plasmodien anschließt und mit den Ciliaten nur das äußerliche Merkmal der Geißeln gemein hat. Auf die sehr interessante Entwicklung können wir hier nicht eingehen.

Es sei nur erwähnt, daß die im Frühjahr zu findenden kleinen, wenig kernigen Formen von 40—50 μ Länge (Fig. 47c), die aus den großen Individuen durch rasch folgende Teilungen hervorgehen, und die kleinen kugeligen Cysten (Fig. 47d) im Zusammenhang stehen mit einer geschlechtlichen Fortpflanzung (Gametogonie). Die Cysten dienen zugleich der Neuinfektion.

Balantidium entozoon (Clap. Lachm).

Neben der eben kurz besprochenen *Opalina* kommen im Darm des Frosches noch zwei echte Ciliaten vor und zwar zwei Angehörige der Ordnung Heterotricha, nämlich *Balantidium entozoon* und *Nyctotherus cordiformis*.

Fig. 48. **Balantidium minutum** (Schandinn) aus dem Darm der Menschen. P Peristom, c. v. contractile Vacuole, m. an Macronucleus, mi. n. Miconucleus. Nach Schandinn aus Doflein.

Die Heterotricha besitzen neben der gleichmäßigen Bewimperung eine mit besonders großen Cilien oder Membranellen ausgestattete adorale Zone, die gewöhnlich einen von rechts nach links gewundenen Verlauf nimmt und zur Bildung eines mehr oder minder umschriebenen Peristomfeldes führt. Die Seite, auf der sich Mund und Peristom finden, wird Bauchseite genannt. Man kann sonach an diesen Formen eine ventrale und dorsale, rechte und linke Seite unterscheiden.

Das *Balantidium entozoon* ist die häufiger vorkommende von beiden Formen. Sie hat ovale oder elliptische Gestalt mit etwas abgestutztem Vorderende.

Das Peristom ist ein dreieckiges vorn breites, nach hinten

oralwärts schmaler werdendes, mehr oder minder riemenartig vertieftes Feld, das sich in einen sehr kurzen Schlund fortsetzt (Fig. 48).

Der Körper ist deutlich längsgestreift (Fig. 49), die Oberfläche gleichmäßig mit kurzen Cilien bedeckt. Unter der Pellicula, der verdickten Zelloberfläche, findet sich zunächst eine deutliche ectoplasmatische Alveolarschicht, dann erst folgt das mit allerhand Nahrungs- und Stoffwechselprodukten (Schleim, Fetttropfen) erfüllte Entoplasma. Bei *Balantidium entozoon* finden sich vier contractile Vacuolen, deren Spiel im Leben deutlich beobachtet werden kann.

Der Macronucleus (somat. Kern) ist bei dem Froschbalantidium nierenförmig und enthält viel chromatische Substanz, die staubartig verteilt ist (vgl. hierzu Fig. 49 von *B. coli* aus dem Darm des Menschen). Der Micronucleus (Geschlechtskern) ist klein, kugelig und bläschenförmig. Die Länge des Tieres beträgt 60—100 μ , die Breite 50—70 μ .

Die Vermehrung ist die für Ciliaten charakteristische Querteilung im freien Zustande (Fig. 49 *b* u. *c*). Auch Conjugationszustände sind beobachtet worden (Fig. 49 *d*).

Fig. 49. **Balantidium coli**. Aus dem Darm des Menschen.
a ausgewachsenes Individuum, rechts oben der Hauptkern, unten Nahrungspartikel,
b und *c* Teilungsstadien, *d* Conjugationsstadien. Nach Leuckart aus Doflein.

Die Danereysten sind kugelig und von einer festen Membran umgeben.

Auch beim Menschen kommen zwei Arten dieser Gattung vor, davon wir auch die Abbildungen genommen haben. Eventuell kommt ihnen eine pathogene Bedeutung zu.

Zur Unterscheidung dieser Arten sei hier noch eine Bestimmungstabelle der Gattung angefügt.

1. Peristom bis zum Äquator des Körpers oder weiter reichend.
 Schlund vorhanden 2
 Peristom viel kürzer, Schlund fehlt 3
2. Vier contractile Vacuolen, Kern nierenförmig, Cyste kugelig
Balant. entozoon Clap. Lachmann.
 Eine contractile Vacuole, Kern kugelig, Cyste oval
Balant. minutum Schaudinn.
3. Zwei contractile Vacuolen 4
 Eine contractile Vacuole, Kern oval, Cyste kugelig
Balant. duodeni Stein.

4. Körpergestalt langgestreckt, spindel- oder walzenförmig

Balant. elongatum Stein.

Körpergestalt oval . . . . . **Balant. coli** Stein.

Nyctotherus cordiformis (Ehrberg).

Die Gestalt dieser selteneren Form ist leicht nierenförmig, die linke Seite etwas gewölbter als die rechte.

Das Peristom ist schmal rinnenartig und erstreckt sich von vorn bis zur Körpermitte (vgl. Fig. 50 von *N. faba*). An seinem linken

Fig. 50. **Nyctotherus faba** (Schaudinn).

P Peristom, *mi. n.* Micronucleus, *ma. n.* Macronucleus, *c. v.* contractile Vacuole.

Nach Schaudinn aus Doflein.

Rand weist es eine Reihe längerer adoraler Wimpern auf, die sich bis in den Schlund erstrecken. Der Schlund ist lang und sichelartig gekrümmt (bei der hier abgebildeten abweichenden Art dieser Gattung [aus dem Menschen] ist der Schlund viel kürzer). Am Hinterende eine deutliche Afterröhre.

Das Ectoplasma ist dünn, das Entoplasma grobmaschig; es enthält keinerlei feste Nahrungselemente, das Tier scheint nur flüssige Nahrung aufzunehmen. Eine contractile Vacuole am Hinterende. Der Großkern ist nierenförmig (bei der abgebildeten *Nyctotherus faba* aus dem Darm des Menschen kugelig und mit 4—5 großen Chromatinansammlungen an der Kernmembran, was für diese Form charakteristisch ist). Der kugelige Kleinkern liegt dem Macronucleus dicht an.

Register.

- Abbéscher Beleuchtungsapparat 9.
 Abfüllen der Nährböden 35.
 Abimpfen unter dem Mikroskop 15.
 Absoluter Alkohol 8.
 Aceton 149.
 Achromat. Substanz 99.
 Aehsenfaden 164.
 Aehsenstab 118.
 Ac. carbolicum 8.
   — gallicum 69.
   — tannicum 66, 69.
 Adorale Zone 166.
 Agametische Fortpflanzung 101 f.
 Agar 13, 33, 107.
   — alkalischer 33 f.
   — blutbestrichener 71.
   — Blutagar 122.
   — dreiprozentiger 33.
   — Herstellung 33.
 Agarplatten, Gießen von 13.
 Agglutination 28, 78.
 Aggregatzustand des Protoplasmas 98.
 Alexine, s. baktericide Wirkung des Blutserums.
 Alkohol 5, 8.
   — salzsaure 8, 97.
 Alkoholische Lösungen 8.
 Alveolärer Bau s. Wabenbau.
 Alveolarsaum 98, 114.
 Amboceptor 88.
 Ametabol 164.
 Amitose 110.
 Amöbina 103 ff.
 Anilin 9.
   — -violett 9, 18.
   — -wasser 9.
   — -xylol 48.
 Anisogamie 101.
 Anopheles 135.
 Anreicherung von Choleravibrien 46.
   — von Typhusbazillen für Schnittpräparate 23.
 Antennen 135 f.
 Antitoxin XXXVII.
 Antrocknen 48, 122.
 Aqua cresolica 51.
 Argentum nitricum 69, 148.
 Ascitesflüssigkeit 5.
 Aspergillus 59.
   Aspergillus flavus 91.
   — *fumigatus* 91.
   — *nidulans* 92.
   — *niger* 92.
 Aufbewahren der Kulturen 22, 58.
 Aufhellen der Milch 33, 89.
 Aufkleben der Schnitte 23.
 Ausstrichpräparate 11, 106, 121.
 Autogamie 102.
 Axialfibrille 118.
   Babesia bovis 146.
   — *canis* 121, 144 ff.
 Bac. anthracis 11, XXII.
   — *botulinus* XXVII.
   — *cholerae gallinarum* IV, XXII.
   — *coli* III, XLI.
   — *dysenteriae* XXXV.
   — *enteritidis* XXVIII.
   — *erysipelatos suum* IV.
   — *influenzae* XXVI.
   — *mallei* XXXI.
   — *mesentericus* 32.
   — *mycoides* 32.
   — *oedematis maligni* XXIII.
   — *paratyphi* XXXV.
   — *phosphorescens* XLII.
   — *prodigiosus* XIX, XXII.
   — *proteus* XVII.
   — *pyocyaneus* XIX, XXII.
   — *tetani* XXV.
   — *tuberculosis* VII.
   — *typhi* III, XXII, XXXIII.
 Bactericide Wirkung des Blutserums XXXVI.
 Bacteriolyse XXI.
 Balantidium 166 f.
 Bandform 142.
 Basalapparat 115.
 Basalkörper 100, 114 f.
 Befruchtung 101.
   Befruchtungscysten 102.
   Befruchtungskern 111.
 Beize 66, 96.
 Belag, Aussehen des 32.
 Beleuchtung 9, 96.
 Beseitigen der Kadaver 17.
   — der Kulturen 24.
 Binnenkörper 99.
 Binucleata 103, 119.

- Birnformen 144.
 Bismarckbraun 7.
 Blepharoplast 100, 114, 122 ff., 144.
 Blutentnahme 74, 121.
 Blutagar 122.
 Blutserrn. Gewinnung von Schlachttieren 33.
 — Löfflersches 35.
 — menschliches 6.
 — bactericide Wirkung XXXVI.
 Boden, Keime im V.
 Bodo 115.
 Boraxkarmin 96, 106.
 Bordeauxrot 96, 107.
 Borsäure, Nachweis 33.
 Botulinus XXVII.
 Bouillon 33.
 Brot als Nährboden 91.
 Buttersäurebacillen XX.

 Carbol s. Karbol.
 Caryogamie 155.
 Caryosom 99 f.
 Celloidin 27.
 Centralfasern 123.
 Centalkorn 120.
 Centrosoma 100.
 Cercomonas 114.
 Chamberlandfilter 90.
 Chemische Desinfektion 51 ff.
 Chlorcalcium 4.
 Chloroform 52.
 Cholera diagnose 45.
 Choleraähnliche Vibriolen X, XXII.
 Chromatin 99, 109.
 Chromidien 99.
 Chromomonadinae 103.
 Chromosom 120.
 Chromsäure 21.
 Chrysoidin 8, 40.
 Ciliata 100, 102, 104, 163.
 Ciliophora 104.
 Cnidosporidia 104.
 Coccidia 101, 103, 153.
 Colibacillen II.
 Colititer XLI.
 Complement 87.
 Conjugation 101 f.
 Conjunctiva 90.
 Conidien 91.
 Contractile Vacuole 98, 113 f.
 Copulation 101.
 Corneale Infektion 41.
 Corynebacterium 40.
 Culex 128, 135.
 Cuprum sulfuricum 8.
 Cuticula 159.
 Cyste 102.
 Cystoflagellata 103.
 Cytopyge 164.
 Cytostom 114, 118, 164.

 Dampfdesinfektion 50.
 Dampftopf 3.
 Deckglaspräparate 10, 14, 106, 121.

 Delafields, Hämatoxylin 66, 92, 96, 106.
 Desinfektion, chemische 51.
 — der Hände 54.
 — des Mikroskops 10.
 — durch Sonnenlicht 54.
 Deutomerit 159.
 Diagnosticum, Fickersches 78.
 Dinoflagellata 103.
 Diphtheriebacillen IX.
 Diphtheriegift XXXVII.
 Diplococci 36, 54.
 Diplococcus lanceolatus XV.
 Diplosom 114.
 Doppelbefruchtung 102, 111.
 v. Drigalski-Conradischer Nährboden 77 ff.
 Dysenterieamöben 112.
 Dysenteriebacillen XXXV.

 Ectoplasma 98, 105 ff.
 Eibefruchtung 101.
 Eidechsen 105, 107, 115.
 Eigenbewegung 10, 15.
 Eimeria schubergi 153.
 — stiedae 156.
 Einbetten 27.
 Einschmelzen von Kulturen 22.
 Eintrocknen, Prüfung der Widerstandsfähigkeit gegen 48 ff.
 Eisenhämatoxylin 96, 106, 115, 156.
 Eisenoxychlorid 80.
 Eisenoxydammoniumsulfat 96.
 Elastische Fasern bei Protozoen 98, 113.
 Empfängnishügel 154.
 Encystierung 102.
 Endoscher Nährboden 77 ff.
 Entamoeba buccalis 105, 107, 113.
 — coli 105, 108, 109, 112.
 — histolytica 112.
 Entoplasma 98.
 Entwicklungszyklus 103, 110, 120.
 Entwicklungshemmende Wirkung 51, 53.
 Eosin 92, 96.
 Epimerit 159.
 Epizootien unter den Versuchstieren 7.
 Erdamöben 105, 107.
 Erdbazillen V.
 v. Ermenghemsche Geißelfärbung 66, 69.
 Essigsäures Methylenblau 8, 40.
 Euglenoidina 103.
 Excretorganellen 98.
 Exsiccator 4.
 Exsiccatorfett 9.

 Farbstoffe 4, 96.
 Farbstoffbildende Bakterien 16, 57, 62.
 Farbstoffniederschläge 18.
 Färbung, allgemeines 11, 15.
 — mit Eisenhämatoxylin 106.
 — von Fibrin 59.
 — von Geißeln XXIV.
 — nach Giemsa 122, 148.
 — nach Gram 18, 29.
 — nach Heidenheim 106, 115, 156.
 — von Kapseln 21.
 — mit Karmin 30, 106.
 — in Paraffin 88.

- Färbung mit Pyronin-Methylgrün 75.
 — von Schnittpräparaten 23, 29, 66, 89, 148.
 — von Spirochaeten mit der Silbermethode 148.
 — von Sporen 20.
 — von Tuberkelbazillen im Ausstrich 35.
 — — — im Schnitt 66.
 — nach Weigert (Gram) 48, 59, 92.
 — — — mit Eisenchlorid-Hämatoxylin 106.
 Fasern, elastische, bei Protozoen 98, 113.
 Ferrosulfat 66.
 Fibrinfärbung 59.
 Fickersches Diagnostikum 78.
 Filtrieren durch Tonkerzen 90.
 Fischen 15.
 Fixieren von Ausstrichpräparaten 11, 27, 39, 96, 106, 122.
 — von Organen mit Formalin 19.
 — — — mit Sublimat 61, 107.
 Flagellata 100, 102 f., 113.
 Fleischvergiftungsbazillen XXVII, XXVIII.
 Fleischwasser 33.
 Foraminifera 103.
 Formalindesinfektion 52.
 Formalinfixation 19.
 Fortpflanzung der Protozoen 100 f.
 — multiple 101, 114, 125.
 Fortpflanzungsysten 102.
 Fraktionierte Sterilisierung 56.
 Friedländersche Bazillen XI.
 Fuchsin 9, 11.
 Fuchsinulfatagar 77 ff.
 Fühler 136 f.
 Gameten 101 f., 109.
 Gametenkerne 102.
 Gametocyten 101.
 Gametogonie 101 f., 103.
 Gärtnerische Fleischvergiftungsbacillen XXVIII.
 Geflügelcholera IV, XXII.
 Gegenfärbung 18, 30, 66, 107.
 Geißeln XXIV, 113, 148.
 Gelatine zur Protozoenuntersuchung 105, 115, 164.
 Gelatinebereitung 33.
 Gelatine, alkalische 34.
 Gelatineplatten 13.
 Gelzustand 99.
 Generationswechsel 103, 120.
 Generative Chromidien 111.
 Generatives Chromatin 100.
 Geschlechtschromidien 100, 116.
 Geschlechtskerne 109, 115.
 GiemsaLösung 122, 148.
 Giftbildung 89.
 Glasdosen 4.
 Glaskolben 2.
 Glycerinagar 33.
 Glycerinäthergemisch 89.
 Gonococcen XXX.
 Gramsche Färbung 18, 29.
 Gram-Weigertsche Färbung 48, 59, 92.
 Granaten 48.
 Granula 116.
 Gregarinen 101, 159.
 Gregarinida 103, 159.
 Haematopinus spinulosus 125.
 Haematoxylin 66, 92, 96, 106, 156.
 Haemolyse XXXII.
 Haemophysalis 146.
 Haemoproteus noctuae 121, 128.
 Haemosporidia 101, 120 ff.
 Halbmonde 143.
 Halteridiumformen 132.
 Hammerische Dosen 4, 63.
 Händedesinfektion 54.
 Hängende Tropfen 10, 14.
 — — Kultur im 19.
 Hauptgeißel 113.
 Hauptkern 109, 120.
 Hefen XVI.
 Heidenhainsches Haematoxylin 96, 106, 115, 156.
 Heilserum 90.
 Heliozoa 103.
 Hermannsche Flüssigkeit 96, 106.
 Heteropole Mitose 129.
 Heterotricha 104, 166.
 Hitze, Widerstandsfähigkeit gegen 49 ff.
 Hohe Schicht 62, 69.
 Holotricha 104.
 Hühnercholera IV, XXII.
 Hypotricha 104.
 Immunisierung XIII, XXI, XXXII.
 Immunisierungseinheit 90.
 Indifferente Formen 129, 141.
 Infektion, corneale 40.
 — intraperitoneale 36, 40.
 — intravenöse 40.
 — subkutane 13.
 Influenzabazillen XXVI.
 Indolbildung 28, 45.
 Involutionsformen XXII, 56.
 Isogameten, Isogamie 101, 114.
 Jodalkohol 97, 106.
 Jodlösung 8, 18.
 Kadaver, Vernichten der 7.
 Kalilauge 9.
 Kaliumnitrat 33.
 Kaliumpermanganat 57.
 Kalkmilch 53.
 Kaninchen 6.
 Kapillarattraktion, Aufkleben mit 23.
 Kapselbacillen XI.
 Kapselfärbung 21.
 Karbolfuchsin 9, 11.
 Karmin 8, 30, 96, 104.
 Kartoffeln 14.
 Karyosom s. Caryosom.
 Keimzählung 53.
 Keratomykosis aspergillina 92.
 Kern 99 f.
 Kernkörperchen 99.
 Kernmembran 99.
 Kernsaft 99.

- Kernstab 147, 150.
 Kernteilung 100.
 Kippischer Apparat 63.
 Kirschbaumharz 163.
 Klärung mit Eiweiß 34.
 Klatschpräparate 20, 107.
 Klingelthermometer 50.
 Knospung 57, 101, 113.
 Kochsalzlösung, physiol. 9, 97.
 Koli s. Coli.
 Kontaktklingelthermometer 50.
 Körnchenfärbung 7, 40.
 Krankheitssymptome an Versuchstieren 16,
 29, 71, 76, 89.
 Kresolseifenlösung 9, 51.
 Kristallviolett 8, 40, 79.
 Kultur im hängenden Tropfen 19.
 — der Amöben 107.
 — der Anaëroben XX.
 — der Spirochaeten 149.
 — der Trypanosomen und Haemosporidien
 122.
 Künstliche Beleuchtung 9, 96.
 Kupfersulfat 8.

 Labium 136.
 Lakmuslösung 5, 35, 79.
 Lakmusmolke 25, 26, 35.
 Lakmus-Nutrose-Milchzuckeragar 77 ff.
 Lakmuspapier 34, 77.
 Laus 125.
 Leuchtbakterien XLII.
 Leukocyten, Unterscheidung von Amöben
 108.
 Leucocytozoon ziemanni 147.
 Levaditi, Schnittfärbung nach 148.
 Lichtgrün 96, 107.
 Lichtwirkung 54.
 Linin 99, 109.
 Liq. ferri oxychlorati 80.
 — — sesquichlorati 74.
 Lithioncarbonat 8, 92.
 — -chlorid 66.
 — -karmin 8, 30.
 Lithobius 153.
 Löfflersche Beize 96, 148.
 — sches Methylenblau 9.
 — Serum 35.
 Lohinfus, Amöben aus 105, 107.
 Lokaler Tetanus 71.
 Lokomotorischer Kern 100, 120.
 Luftkeime V.
 Laubricus herculeus 159.
 Lupe 4, 32.

 Macrogameten, Macrogametocyten 101.
 Malariaparasiten 102.
 Malignes Ödem XXIII.
 Mallens XXXI.
 Männlicher Kern 102.
 Mastigophora 103.
 Mäuse, Mäusezange 6.
 Meerschweinchen 6.
 Meningococcen XXIX.
 Menschliches Serum 6.
 Merista 11.
 Merozoiten 101, 141 ff.
 Metabol 164.
 Methylenblau 8.
 — essigsäures 8, 40.
 — Löfflersches 8, 9, 11.
 — polychromes 89.
 Methylgrün 75.
 Methylviolett 8, 10.
 Mier. gonorrhoeae XXX.
 — intracellularis XXIX.
 — pyog. aureus VIII.
 Microgameten, Microgametocyten 101.
 Micropyle 156.
 Microsome 98.
 Mikroskop 4, 9, 95.
 Milch 14, 33.
 — Aufhellung der 33, 89.
 — Buttersäuregärung der 62 f., 67.
 Milchzucker 79.
 Milzbrandbacillen II, XXII.
 Milzvergrößerung 17.
 Mitotische Kernvermehrung 110.
 Molekularbewegung 11.
 Monocystis 160 f.
 Mucor 57.
 Multiple Fortpflanzung 101.
 Mycobacterium tuberculosis s. Tuberkel-
 bacillen.
 Mycetozoa 103.
 Myoplane 123.

 Nackenschlag 41.
 Nährböden 5, VI.
 Natrium acetieum 69.
 — citricum 97.
 Natriumnitrit 28.
 Natriumsulfat 79.
 Nebengeißel 113.
 Neissersehe Körnchenfärbung 8, 40.
 Neosporidia 104.
 Neutralisation 34.
 Neutralrot 8, 25, 26.
 Nitrit 28.
 Normalgift 90.
 Normalöse 28.
 Normalserum 90.
 Nuclein 99.
 Nucleolen 99.
 Nutrose 79.
 Nyctotherus 168.

 Obduktion 7, 17.
 Oberflächenspannung 98, 105.
 Objektträger, hohlgeschliffene 1, 10.
 Oligotricha 104.
 Oocyste 142.
 Oogamie 101.
 Ookinet 120, 126, 129 ff.
 Opalina ranarum 165.
 Operationsbett 7.
 Oreein 89.
 Organe, Fixation der 19, 61, 107.
 Organellen 164.
 Öse 2, 28.
 Osmiumsäure 66, 96, 122, 148.
 Oxalsäure 43.

- Palpen 135 f.
 Paraffin, Einbetten in 27.
 — Schneiden von 23.
 Paraglykogen 160.
 Parannuclein 99.
 Paratyphusbacillen XXXV.
 Parthenogenese 102, 131.
 Pellicula 114, 164.
 Penicillium 57.
 Pepton 33.
 Peptonisierung 33.
 Peptonstammlösung 33.
 Peptonwasser 34.
 Periplast 114, 120, 123.
 Peristom 165.
 Peritricha 104.
 Permanganat 57.
 Perniciosa 143.
 Petrischalen 1.
 Pfeifferscher Versuch 86.
 Phagocytose 30, 59 XXIV.
 Phenolphthalein 5, 42.
 Physiologische Kochsalzlösung 9, 97.
 Phytonomadina 103.
 Pigmentkörnchen 139.
 Pikrinsäure 6.
 Pikrokarmün 96, 106.
 Piroplasma s. Babesia.
 Plasmodium immaculatum 113.
 — malariae 142.
 — vivax 138 ff.
 Plasmodroma 103, 165.
 Plasmolyse 26, XXII.
 Plasmosome 98.
 Platin 99.
 Platinchloridosmiumessigsäure 96, 104.
 Platindraht 2.
 Platten 1.
 Plattengießen 12.
 Pneumococcen XV.
 Pneumonomykosis aspergillina 92.
 Pneumoniebacillen, Friedländersche XI.
 Polfärbung 27.
 Polycystida 159.
 Polymastigina 103, 114 f.
 Prodigiosus XIX, XXII.
 Proteosoma 133, 139.
 Protens XVII.
 Protomerit 159.
 Protomonadina 103, 114 f.
 Protoplasma 98.
 Protozoa, System 103.
 Prüfung auf Widerstandsfähigkeit gegen
   Chemikalien 51 ff.
 — — Eintrocknen 48 ff.
 — — Hitze 49 ff.
 Pseudodiphtheriebacillen 91.
 Pseudopodien 98, 105, 108.
 Pseudotuberkelbacillen 91.
 Pyocyaneus XIX, XXII.
 Pyridin 149.
 Pyrogallussäure 63, 149.
 Pyronin 75.
 Rachen, Untersuchung 90.
 Radiolaria 103.
 Raudfaden 113, 119, 123 ff., 147 f.
 Rattenlaus 125.
 Reaktion der Nährböden 35.
 Rezidive 131.
 Reduktion 26.
 Reduktionskern 102.
 Reduktionsteilung 102.
 Regenwurm 160.
 Reinkultur 12, 15.
 Reservestoff 130.
 Resistenz, s. Prüfung auf Widerstandsfähigkeit.
 Restkörper 153, 158, 162.
 Rhizoplast 114 ff.
 Rhizopoda 102, 103.
 Rosettenfigur 125.
 Rotzbacillen XXXI.
 Ruhrmühen 112.
 Ruhrbacillen XXXV.
 Safranin 8, 18, 21.
 Salzsäurealkohol 7, 92.
 Sammlung von Bakterienkulturen 22, 58.
 Sarcosporidia 104.
 Säurebildung der Diphtheriebacillen 43.
 Schimmel XVI, XL.
 Schizogonie 101, 111.
 Schleppgeißel 113.
 Schnittfärbung 23, 29, 66, 89, 107, 148.
 Schnittpräparate, Schneiden der 23.
 — Behandlung vor dem Schneiden 19, 21,
   22, 24, 26, 27, 107, 148.
 Schüttelkultur 25.
 Schutzeysten 102.
 Schweinerotlauf IV.
 Seidenfäden, 48 f.
 Sektion 7, 17.
 Selbstbefruchtung 102.
 Serum, Löfflersches 35.
 — menschliches 6.
 Serumagar 75.
 Silbermethode 148.
 Smegma 91.
 Soda 34.
 Solzustand 99.
 Somatisches Chromatin 99.
 Somatische Chromidien 100.
 Somatischer Kern 117.
 Sonnenlicht, desinfizierende Wirkung 57.
 Speichel 54.
 Speisegelatine 33.
 Spindelfigur 100.
 Spirochaeta 103, 146.
 — balbiani 147 f.
 — buccalis 150.
 — dentium 150.
 — pallida 152.
 — refringens 152.
 Sporen der Bakterien 18, 19.
 — der Protozoen 103.
 — -färbung 20.
 Sporoblasten 157.
 Sporocysten 103, 158.
 Sporogonie 101, 103.

- Sporont 142, 157.
Sporozoen 102.
Sporozoiten 101.
Sprossung 57.
Stammkultur 16.
Stangenagar 33.
Staphylococcen VIII.
Stationärer Kern 102.
Steelmücken 135.
Sterigmen 91.
Sterilisation der Gefäße 9.
— der Nährböden 33 ff.
— fraktionierte 56.
Sternfigur 125.
Streptococcen VIII, 72.
Streptococcus lanceolatus XV.
— pyogenes VIII.
Strohimfus zur Amöbenzüchtung 105, 107.
Stuhl, Desinfektion 53.
— Züchtung von Typhus und Cholera X, XXXIII.
Subkutane Injektion 13.
Sublimat, Fixation mit 61.
— -lösung 9.
— Prüfung der Wirkung auf Bakterien 51, 53.
— -alkohol 96, 106 f.
Suctoria 104.
Sulfit, Nachweis von 33.
Sulfitfuchsinagar 77 ff.
Syncarion 101 f.
System der Protozoen 103.

Tannin 66, 69.
Taster 135 f.
Tausendfuß 153.
Telosporidia 103.
Tertianparasit 138.
Tetanusbazillen XXV.
Tetraden 77.
Tetradenketten 78.
Tierzucht 6.
Titrieren 43.
Toluol 89.
Tonkerze 90.
Tonsillen, Untersuchung 90.
Töten der Tiere 17, 41, 61.
Toxin XXXVII.
Traubenzucker 33.
Trichomastix 118.
Trichomonas 103, 119.
Trichonymphidae 103.
Tropfen, hängender 10.
— hängender Kultur darin 19.
Tropicaparasit 143.
Trypanosoma brucei 121, 124, 128.
Trypanosoma gambiense 124.
— lewisi 121 ff.
Tuberkelbacillen VII, XXXIX.
Typhusbacillen VII, XIII, XXXIII.
Typhusdiagnostikum 78.
Typhusserum XIII.

Undulierende Membran 113, 119, 123 ff.
147 f.
Untersuchen im Wasser 21.

Vacuolen 98.
Vegetativer Kern 100.
Vermehrungscysten 102.
Vernichten der Kadaver 7.
— der Kulturen 24.
Versuchstiere 6.
Verzweigungen 42.
Vibriolen X, XXII.

Wabenbau 98, 105, 114.
Wanderkern 102.
Wasser, Untersuchen im 21.
Wasserbakterien 57, 81.
Wasserstoff 64.
Wassertrockenschrank 3.
Wasseruntersuchung XIV.
— auf Choleravibriolen 45 ff.
— auf Typhusbacillen 80.
Weiblicher Kern 102.
Weigertsche Färbung (Gram) 48, 59, 92.
— Eisenhaematoxylin 96, 106.
— Pikrokarmün 96, 106.
Widerstandsfähigkeit s. Prüfung.
Wurzelbacillus s. Bac. mycoides.

Zählapparat 4, 53.
Zeichnen 96.
Zellafter 163.
Zellmund 114, 118, 164.
Zerfallsteilung 101.
Ziehlsche Lösung 9.
Züchten s. Kultur.
Zuckeragar 25, 33.
Zuckerbouillon 33.
Zuckervergärung 26.
Zuschmelzen der Kulturen 22.
Zweiteilung 101.
Zygote 101.